GeneAmp® *In Situ* PCR System

1000

取扱説明書

JUN.1995 *for ver. 1.0*

PERKIN ELMER

注： GeneAmp® *In Situ* PCR System 1000 は、研究開発のみにご使用ください。

注： 本装置の修理の際には、確認書（付録III. ページ 87～88）をコピーのうえ必要事項を記入し添付してください。

重要：ご購入後、同封されている登録カードに所定の事項をご記入のうえ、弊社まで返送してください。ソフトウェアのバージョンアップ等に必要です。

Trademarks

Perkin-Elmer is a registered trademark of The Perkin-Elmer Corporation.

AmpliCover and MicroAmp are registered trademarks of The Perkin-Elmer Corporation.

Epson is a trademark of Seiko Epson Corporation.

AmpliTaq is a registered trademark of Roche Molecular Systems, Inc.

GeneAmp is a registered trademark of Roche Molecular Systems, Inc., licensed to The Perkin-Elmer Corporation.

The GeneAmp PCR Process, *Taq* DNA Polymerase, and AmpliTaq DNA Polymerase are covered by U.S patents owned by Hoffmann-La Roche Inc., and issued and pending patents owned by F. Hoffmann-La Roche Ltd.

Registered trademarks,etc. used in this document, even when not specifically marked as such, are protected by law.

目次

このマニュアルの使いかた 1

第 1 章 GeneAmp *In Situ* PCR System 1000の設置 3

1-1. 設置条件 4

1-1-1. 設置場所 4

1-1-2. アース 4

1-1-3. 温度、湿度、および環境 4

1-2. 解梱 5

1-3. 電源の接続 5

1-4. 冷却システムおよび加熱システムのチェック 6

第 2 章 GeneAmp *In Situ* PCR System 1000 の概要 11

2-1. GeneAmp DNA Thermal Cyclersと
GeneAmp *In Situ* PCR System 1000の違い 12

2-2. 装置各部の名称 14

2-3. システムソフトウェア 16

2-3-1. システムファイル 16

2-3-2. コンフィグレーションファイルとダイアグノスティックファイル 22

2-3-3. ファイルディレクトリ 22

2-4. システムソフトウェアの呼び出しとキーパッド操作 23

第 3 章 PCRメソッドファイルの作成 25

3-1. 基本操作 26

3-2. プログラムファイル 28

"Hot Start"とは... 29

"Storage"とは... 29

3-2-1. "Hot Start" Soak File と"Storage" Soak File の作成 30

<"Hot Start" Soak FileをFile # 8として設定する手順> 30

<"Storage" Soak FileをFile #13として設定する手順> 32

3-2-2. Step-Cycle Fileの作成 34

<1段階温度 Step-Cycle FileをFile #11として設定する手順> 35

<2段階温度 Step-Cycle FileをFile #12として設定する手順> 39

これまでに行ったこと 42

3-2-3. まとめ 43

3-3. "Hot Start" Soak FileとPCRメソッドの開始方法 45

3-3-1. "Hot Start" Soak Fileのスタート 45

3-3-2. PCR メソッドのスタート 48

第4章 *In Situ* PCRスライドのセット 51
4-1. サンプルスライドの前準備 52
4-1-1. 準備するもの 52
4-1-2. 作業環境の準備 53
4-2. スライドでのサンプルの位置 55
サンプルが中央から外れてしまったとき 56
サンプルが互いに近接している 57
3サンプルより少ない場合 58
4-3. AmpliCover Clip/Discアッセンブリーの取り付け 59
4-3-1. サンプルポジション1 59
4-3-2. サンプルポジション2と3 65
4-4. 本体へのセット 66
4-5. スタートラン 68
<"Hot Start" Soak Fileの中止> 68
<メソッドのスタート> 69
4-6. AmpliCover Clip/Discアッセンブリーの外しかた 72
第5章 GeneAmp *In Situ* PCR System 1000 のメンテナンス 75
5-1. GeneAmp *In Situ* PCR System 1000のメンテナンス法 76
5-1-1. サンプルブロックのクリーニング 76
5-1-2. 装置外面のクリーニング 76
5-1-3. ヒューズの交換 77
第6章 トラブルシューティング 79
6-1. トラブルシューティング 80
6-2. 使用中に停電等で電源が切れた場合 81
付録 83
付録 I. 仕 様 84
付録 II. GeneAmp® *In Situ* PCR System 1000用キット／アクセサリー 85
付録 III. 確認書 86

このマニュアルの使いかた

このマニュアルは、以下の順で記述しています。

1. 装置の設置方法につきましては、第１章を読んで下さい。

2. サーマルサイクラーを初めて使われる場合、第２章から読み始めて下さい。
   第２章では、システムソフトウェアとキーパッド操作について記述しています。

3. すでに、GeneAmp DNA Thermal Cycler や GeneAmp DNA Thermal Cycler 480 を使われたことのある方は、第３章から読み始めることをお薦めします。
   第３章では、メソッドファイルの作成手順について記述しています。

4. 第４章では、*In Situ* PCRスライドをセットするために必要な、システムの使用方法とスタートランについて記述しています。

5. 第５章では、サンプルブロックのクリーニングなど、メンテナンスについて記述しています。

6. 第６章では、システムトラブルの対処について記述しています。

第１章

GeneAmp *In Situ* PCR System 1000の設置

この章では、GeneAmp *In Situ* PCR System 1000の設置方法を説明します。
この章には以下の項目があります。

1-1. 設置条件
- 1-1-1. 設置場所
- 1-1-2. アース
- 1-1-3. 温度、湿度、および環境

1-2. 解梱

1-3. 電源の接続

1-4. 冷却システムおよび加熱システムのチェック

1-1. 設置条件

1-1-1. 設置場所

GeneAmp *In Situ* PCR System 1000 は、安定で水平な場所に設置して下さい。
また、放熱のため、特に側面および背面のまわりは自由に空気が流れるようにして下さい。特に他のサーマルサイクラーのすぐ隣や低い棚の下、直射日光に当たる場所、熱を発する設備のそば、エアードラフト、加熱装置、空調の吹き出し口などの温度変化の激しい場所に、本体を設置しないで下さい。
また湿度が非常に高い場所にも設置しないで下さい。

1-1-2. アース

GeneAmp *In Situ* PCR System 1000 は、感電を避けるために接地しておく必要があります。2端子コンセントは接地保護効果がないので使用しないで下さい。

警告 本体の内部は高電圧になっていますので、外側のカバーを取り外したり、開けたりしないで下さい。

1-1-3. 温度、湿度、および環境

コールド・ルーム(冷蔵室)または冷凍室のなかで作動させないで下さい。
GeneAmp *In Situ* PCR System 1000は、周囲の温度が摂氏15℃～30℃、相対湿度が20%～80%のときに、最も効果的に作動します。

1-2. 解梱

GeneAmp *In Situ* PCR System 1000を注意して取り出し、損傷がないかをチェックして下さい。
搬送時に損傷が発生した場合は、ただちに最寄りの弊社営業所までご連絡下さい。

GeneAmp *In Situ* PCR System 1000 (商品番号 N804-0003) の電源条件は100VAC、50/60Hzです。

付属パーツリスト

品名	数量
電源コード	1本
ユーザーマニュアル	1冊
クイック・リファレンス・ガイド	1冊
In Situ PCR Glass Slides	1ｾｯﾄ (70枚入)
AmpliCover Clips	1ｾｯﾄ (10個入)
AmpliCover Discs	1ｾｯﾄ (50個入)
Assembly Tool	1台
Assembly Tool 用電源コード	1本
Disassembly Tool	1式

1-3. 電源の接続

GeneAmp *In Situ* PCR System 1000 の電源は、100 VAC、50/60 Hzです。

電圧/周波数

AC電圧　：　100VAC (電圧変動 ±10%)
最大消費電力　：　1169 Watts
周波数　：　50/60Hz

装置を専用電源に接続して下さい。延長コードは用いないで、必ず３ピンのソケットを使用して下さい。

重要　設置時、初めて電源を入れる前に、本体を室温 (15℃～30℃)に少なくとも4時間は静置して下さい。

1-4. 冷却システムおよび加熱システムのチェック

GeneAmp *In Situ* PCR System 1000 Thermal Cycler の冷却システムおよび加熱システムをチェックします。

冷却システムのチェック

以下の手順に従って、GeneAmp *In Situ* PCR System 1000 の冷却システムをチェックして下さい。

1. 電源を入れて少なくとも 30分間放置します。

2. 順番に **File** 、**1** 、**Enter** と押すと、次の画面となります。

SOAK FILE
STEP to edit file #1

3. **Step** を押してSoak Fileの温度パラメータを表示させます。

Soak Temperature	
(-5 to 100)	**70℃**

4. **4** を押して温度を 70℃から 4℃に変更し、**Enter**を押して下さい。

End of file
RUN - STORE - PRINT

5. もう一度 **Enter**を押して下さい。以下の画面が表示されます。

SOAK FILE
START to run file# 1

6. **Start** キーを押して 4℃ Soak Fileを実行します。

7. 約15分後に次の画面が表示されます。画面上のブロック温度が3℃～5℃の間であることを確認して下さい。

Soak= 4℃	**Smp= 4℃**
E. T. = 15:00	**File #1**

8. **Stop** キーを2回押して中止します。

● 画面上の温度が3℃～5℃の間でない場合、最寄りの弊社営業所またはフィールドサービス課にご連絡下さい。

加熱システムのチェック

GeneAmp *In Situ* PCR System 1000の加熱システムをチェックするには、ダイアグノスティックファイル中のヒーターテスト(test #3)を実行します。以下の手順に従って実行して下さい。

1. **File** 、 **Yes** の順に押して下さい。以下の画面が表示されます。

Select Function
CONFIG - DIAGNOSTIC

2. **No** キーを押してカーソルを "DIAGNOSTIC" に移動し、 **Enter** を押して下さい。以下のディスプレイが表示されます。

Diagnostic Tests
Enter test # (1 - 6)

ヒーターテストは、ブロックを加熱して、最大加熱速度および最初の15℃の温度上昇に必要な加熱時間を秒単位で測定します。また測定は温度上昇中に行われます。この結果は、テストが完了すると表示されます。

3. test #3のヒーターテストを実行しますので、**3** と入力し、次に**Enter** を押して下さい。テストが開始され、以下の画面が表示されます。

```
Heater Test Blk = xxC
going to 35C . . .
```

・画面に表示されるように、ブロック温度は最初35℃に加熱されます。実際のブロック温度は上の行に摂氏温度で表示され、画面上では "xxC"と表示されています。

・ブロック温度が35℃になると、以下の画面が表示されます。

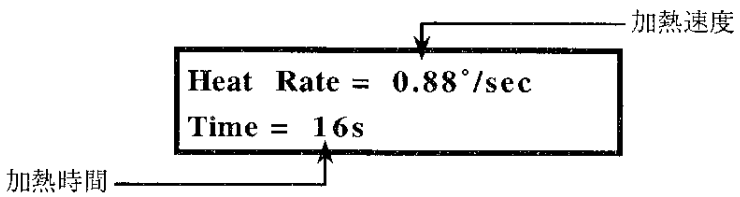
```
Heater Test Blk = 35C
wait 1 min . . .    : xx
```

・画面の下の行に表示されているように、ブロック温度は1分間35℃で維持されます。実際のブロック温度(35℃)が上の行に表示され、下の行には時間(xx)が表示されます。

・1分後、ブロックは75℃に加熱され始め、以下の画面が表示されます。

```
Heater Test Blk = xxC
heating . . .
```

・現在のブロック温度が再び画面に表示されます。ブロック温度が75℃に達するとテストは終了し、画面に結果が表示されます。



4. ヒーターは電源電圧から電力を直接供給されるので、加熱速度はその電圧により 変化します。結果を表1-1と比較して下さい。

表1-1 電源電圧によるヒーターテスト

電源電圧	加熱速度	加熱時間
90 - 98	0.67℃/秒以上	30秒以下
99 - 103	0.80℃/秒以上	25秒以下
104 - 110	0.90℃/秒以上	23秒以下

テスト終了時、画面上の数値が、表1-1に示された正常範囲値以外である場合、ヒーターに問題がある可能性がありますので、最寄りの弊社営業所またはフィールドサービス課までご連絡下さい。

5. テストを終了するには **Stop** キーを押して下さい。ダイアグノステックファイル中の最初の画面が再び表示されます。再度 **Stop** を押して、ダイアグノステックファイルを終了して下さい。

以上でGeneAmp *In Situ* PCR System 1000のシステムチェックは終了です。

第2章

GeneAmp *In Situ* PCR System 1000の概要

この章では、GeneAmp *In Situ* PCR System 1000の装置の各部名称やシステムソフトウェアについて説明します。
この章には以下の項目があります。

2-1. GeneAmp DNA Thermal CyclerとGeneAmp *In Situ* PCR System 1000の違い

2-2. 装置各部の名称

2-3. システムソフトウェア
- 2-3-1. システムファイル
- 2-3-2. コンフィグレーションファイルとダイアグノステックファイル
- 2-3-3. ファイルディレクトリ

2-4. システムファイルの呼び出しとキーパッド操作

2-1. GeneAmp DNA Thermal CyclersとGeneAmp *In Situ* PCR System 1000の違い

以下に示す一般的なプログラムの作り方は、各装置のサンプル加熱・冷却様式の違いに基づいています。

サイクル中のHold time (保持時間) と温度の設定

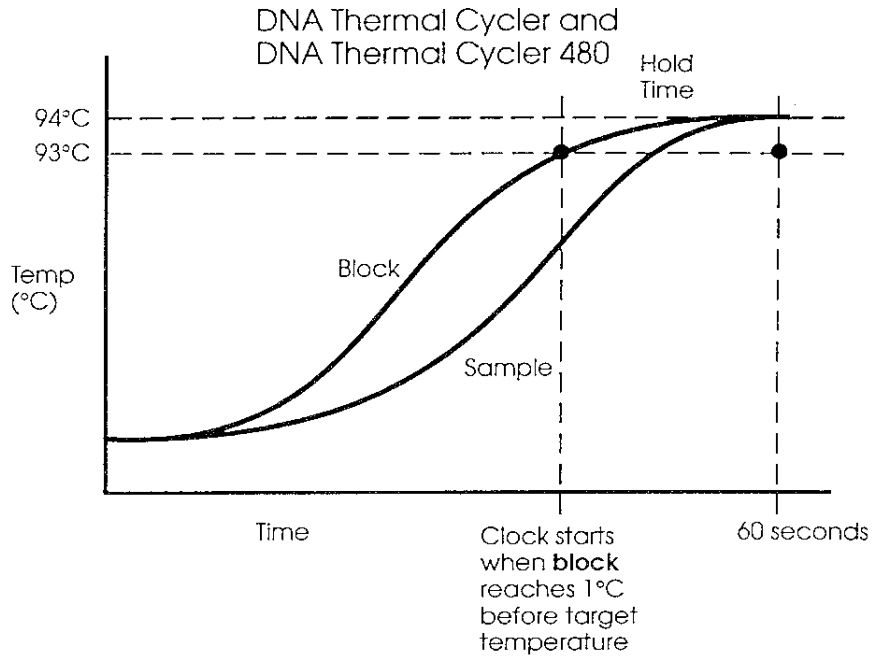
GeneAmp *In Situ* PCR System 1000の各設定温度でのHold timeは、DNA Thermal CyclerやDNA Thermal Cycler 480のStep-Cycle FileやThermo-Cycle Fileの設定よりも短くすることができます。

なぜなら、DNA Thermal Cycler (とDNA Thermal Cycler 480) の場合、ブロックが設定温度の1℃前になるとHold timeのクロックがスタートするのに対し、GeneAmp *In Situ* PCR System 1000では、サンプルが設定温度の1℃前になった時点でスタートするからです。

図2-1に表わすように、ブロックはサンプルより先に設定温度に到達するため、DNA Thermal CyclerやDNA Thermal Cycler 480で設定したHold timeは、実際にサンプルが設定温度に到達するまでの時間を考慮して余分に設定しなければなりませんでした。

そのためDNA Thermal Cycler / GeneAmp Reaction Tubes (N801-0180)使用時、サンプルが設定温度に到達するまで1分以上、またDNA Thermal Cycler 480 / GeneAmp Thin-walled Reaction Tube with Cap (N801-0737)使用時、サンプルが設定温度に到達するまで45秒以上のHold timeが必要でした。

しかしGeneAmp *In Situ* PCR System 1000は、スライドガラス上の薄膜となった反応液をコントロールするため、ブロックとサンプルと温度誤差が最小となり、1分以下のHold timeを可能にしました。



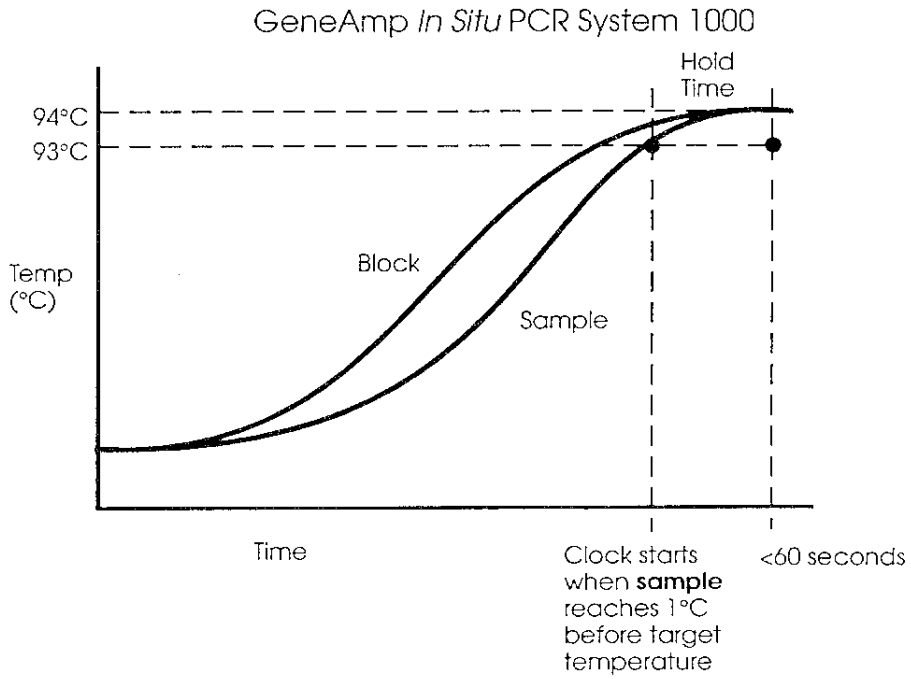


図2-1. DNA Thermal Cycler とDNA Thermal Cycler 480 とGeneAmp *In Situ* PCR System 1000の加熱曲線

2-2. 装置各部の名称

装置外面の名称を図2-2に、装置にスライドガラスをセットしたときの断面図を図2-3に示します。

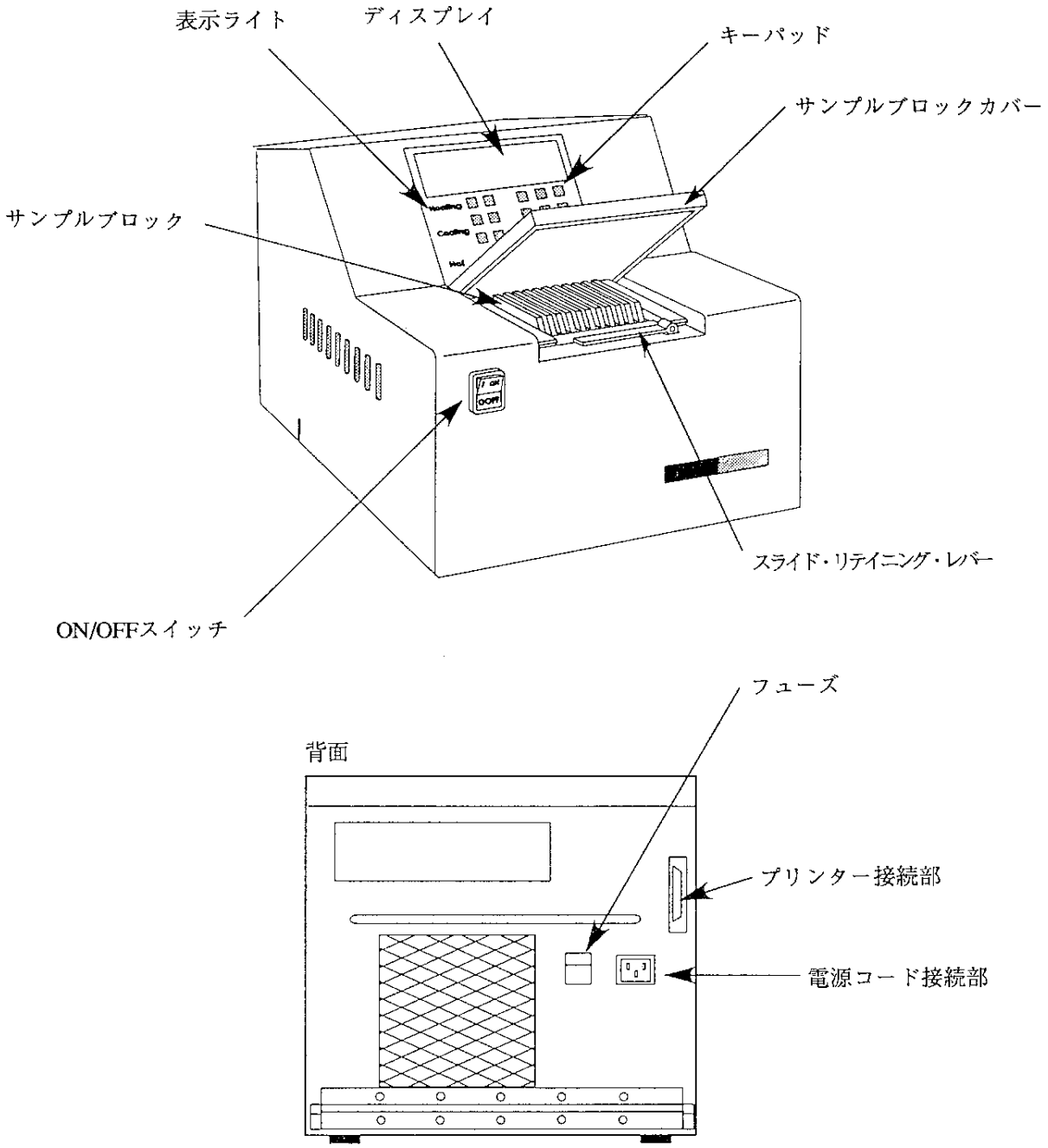


図2-2. GeneAmp *In Situ* PCR System 1000

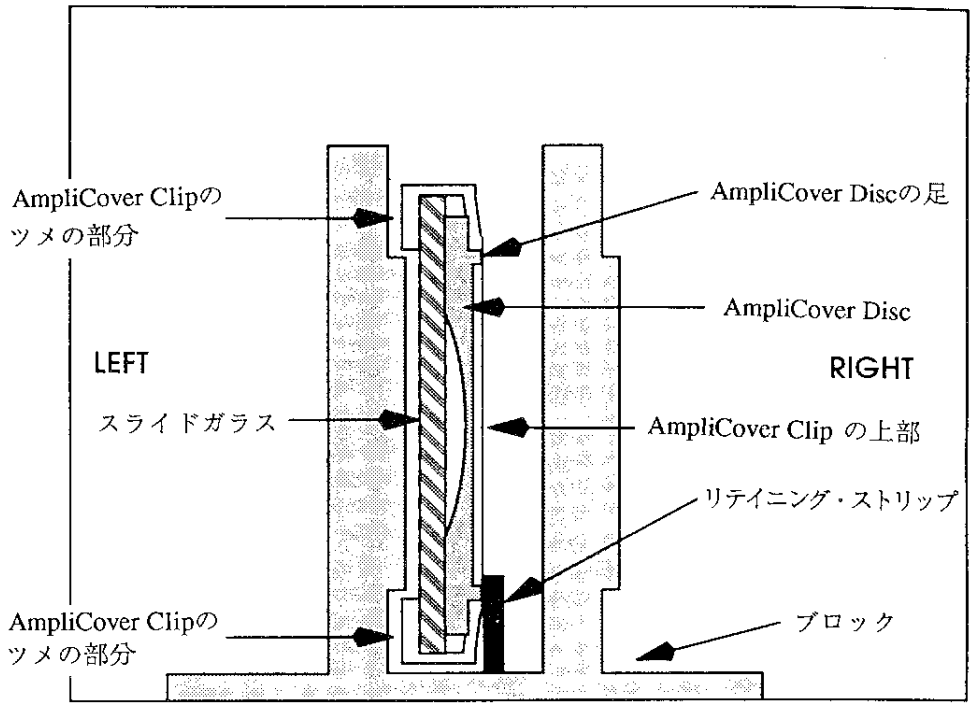
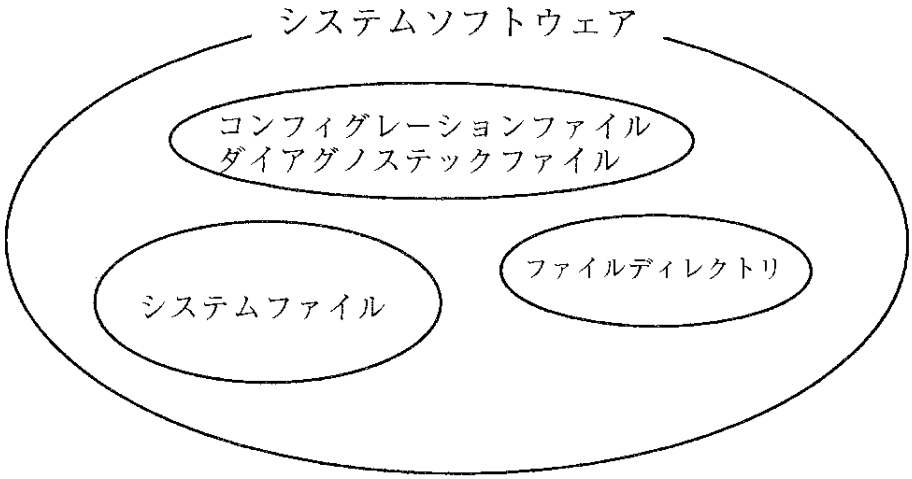


図2-3. GeneAmp *In Situ* PCR System 1000にスライドガラスをセットしたときの断面図

2-3. システムソフトウェア

ここでは、*In Situ* System 1000のソフトウェアについて説明します。
この装置のソフトウェアは、機能的に3つ(システムファイル, コンフィグレーションファイルとダイアグノスティックファイル, ファイルディレクトリ) に大別されます。



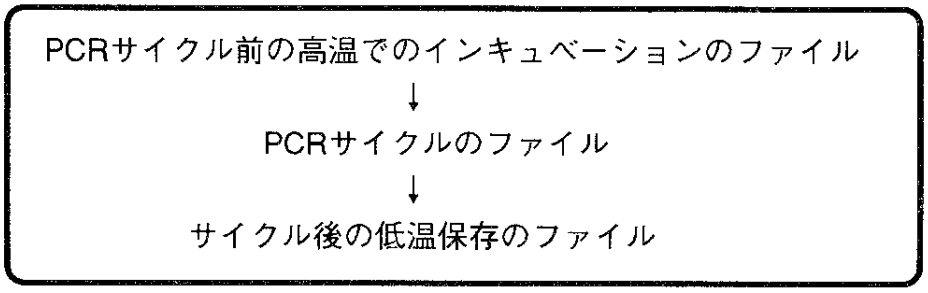
2-3-1. システムファイル

システムファイルには、次のデフォルトファイルが用意されています。

File #1 Soak File
File #2 Time Delay File
File #3 Thermo-Cycle File
File #4 Step-Cycle File
File #5 Demonstration File
File #6 Demonstration File

ファイルで設定する温度／時間パラメーターの組を"セグメント"と呼びます。
予め保存されているデフォルトファイル (File#1～6) の他に使用者独自のファイルをユーザーファイルとして、#7～99に計93ファイルまで作成・保存することができます。
ユーザーファイルの作成は、まず目的とするファイルの種類を# 1～4 のデフォルトファイルから選択して読み込みます。
そして、そのファイルの各セグメントを変更して独自のプログラムとした後、別のファイルナンバーとして保存することで作成されます。

またこれらユーザーファイルは、いくつかのファイルを互いにつなぎ合わせて、一連のファイルとした"メソッドファイル"を作ることもできます。メソッドファイルの一般的な例を以下に示します。



このメソッドファイルは、Step-Cycle FileとSoak Fileを組み合わせて作成します。実際のファイル作成例を第3章に記述しました。

File #1～4の各ファイルの特徴について、P18 以降に示します。
またFile #5,6 のデモファイルにつきましては、英文マニュアル Appendix B を参照して下さい。

< *Soak File (File #1)* >

Soak File は、設定温度にできるだけ早く到達し、**Stop**キーを押して停止させるまで、その温度を保持し続けるインキュベーションファイルです。このファイルは、"Hot Start "を実行するとき、またPCR反応後のサンプルを低温で終夜保持する"Storage"などに使用します(P29 参照)。

Soak Fileのデフォルトの温度曲線を図 2-4に表わします。
Soak File の設定手順につきましては、第 3 章をご覧下さい。

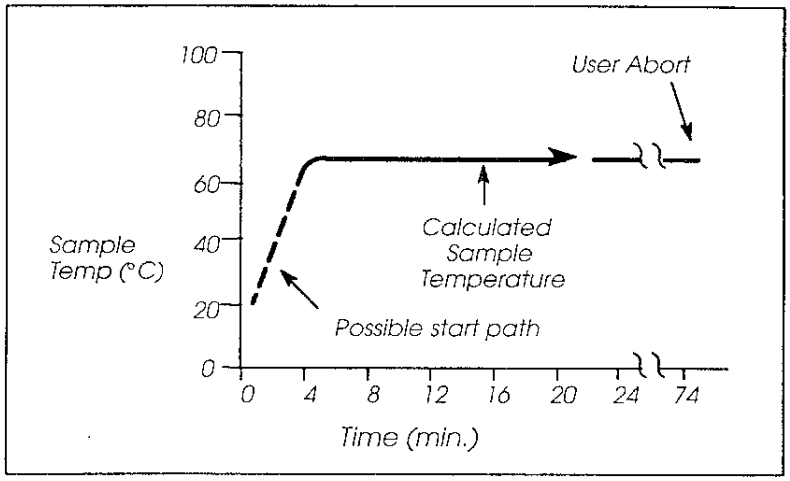


図2-4. Soak File のデフォルトの温度曲線

< *Time Delay File (File #2)* >

Time Delay File は、設定温度を設定時間分だけ維持するファイルです。このファイルは、PCR 反応前に、DNAサンプルに存在する不要なプロテアーゼやヌクレアーゼ等を失活させるためや、伸長プロセスを完了させるための72℃でのポストPCRインキュベーションなどの目的に使用できます。

Time Delay Fileは、メソッドファイル中で他のファイルにリンクさせることもできます。

Time Delay File のデフォルトの温度曲線を図2-5 に表わします。

Time Delay File のより詳しい操作方法につきましては、GeneAmp *InSitu* PCR System Quick Reference Guideか英文マニュアルのAppendix Aを参照して下さい。

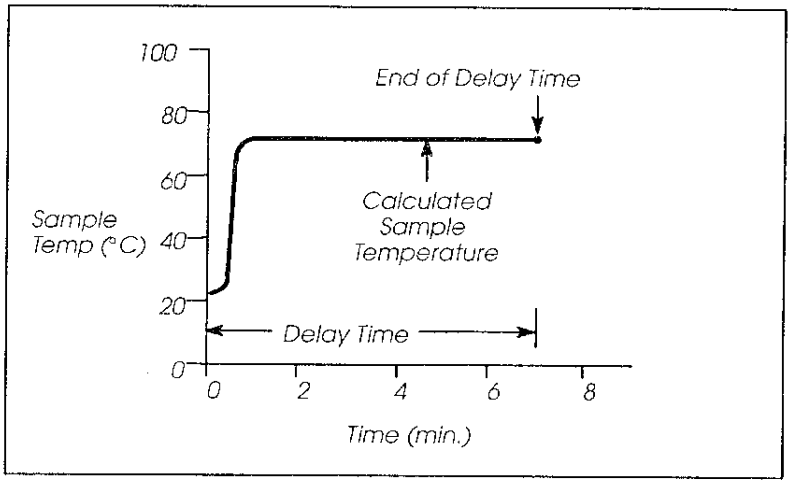


図2-5. Time Delay File のデフォルトの温度曲線

< *Thermo-Cycle File (File #3)* >

Thermo-Cycle Fileは、1～16の温度/時間セグメントと99サイクルまでのサイクル数が設定できるPCR増幅用ファイルです。
このファイルの特徴はramp time (ある設定温度から次の設定温度に移るときにかかる時間)の設定で、Thermo-Cycle Fileは、ramp timeも１つのセグメントとして設定できます。したがって奇数のセグメントには、設定温度とramp time が含まれ、偶数セグメントには、設定温度とHold time が含まれます。
ramp timeのデフォルト値は１秒です。これはサンプルを可能な限り早く設定温度に達することを示しています。３段階温度PCRを行うときは、６つのセグメントと１つの終結セグメントを作成します。
また完全なPCRメソッドを作成するために、ファイルを他のファイルとリンクすることが可能です。
Thermo-Cycle Fileのデフォルトの温度曲線を図 2-6に表わします。
Thermo-Cycle Fileの詳しい操作方法につきましては、GeneAmp *InSitu* PCR System Quick Reference Guideか英文マニュアルのAppendix Aを参照して下さい。

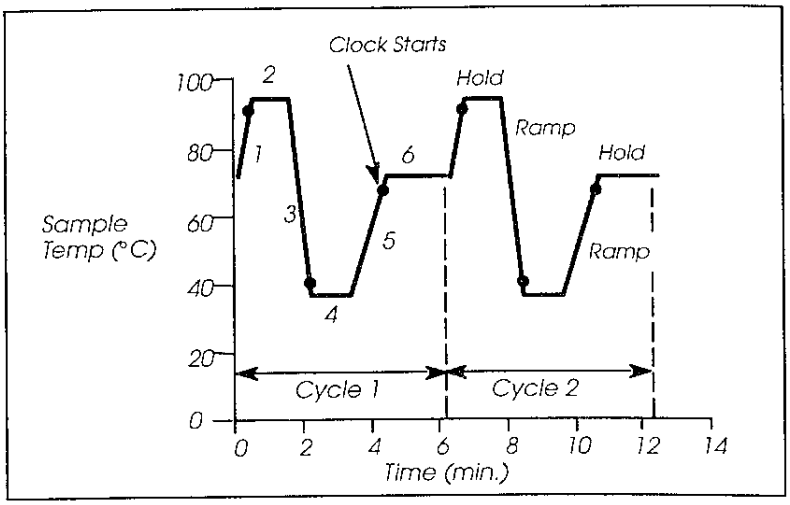


図2-6. Thermo-Cycle File のデフォルトの温度曲線

< *Step-Cycle File (File #4)* >

Step-Cycle FileもThermo-Cycle Fileと同様に、１～16の温度/時間セグメントとサイクル数が99サイクルまで設定できるPCR増幅用ファイルです。
しかし、設定時間の昇降温度勾配(ramp time)の設定はできず、昇降温度勾配は、装置の最大能力で行われます。
このファイルの特徴は、各サイクルのどのセグメントでもHold timeを自動的に延長することができます。
また完全なPCRメソッドを作成するためにこのファイルを他のファイルにリンクすることが可能です。
Step-Cycle File のデフォルトの温度曲線を図2-7 に表わします。
Step-Cycle Fileの設定手順につきましては、第３章をご覧下さい。

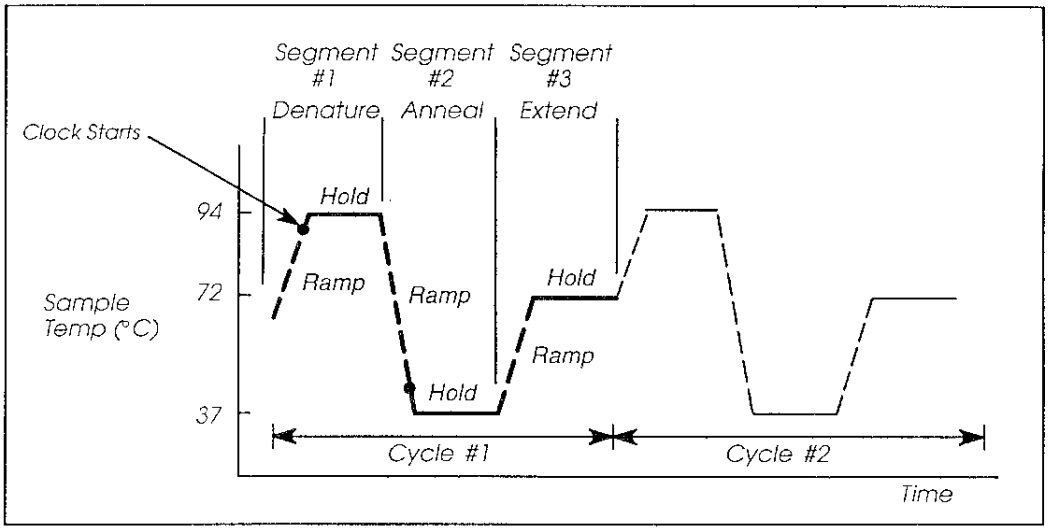


図2-7. Step- Cycle File のデフォルトの温度曲線

2-3-2. コンフィグレーションファイルとダイアグノスティックファイル

これらのファイルは、プリンターの使用やポーズの時間変更、ユーザーファイルの消去、加熱/冷却速度等のチェックを行う時に用います。
詳しくは英文マニュアル Appendix C を参照して下さい。

2-3-3. ファイルディレクトリ

システムファイルディレクトリ を全てのファイル又はファイルの種類別に呼び出すことができます。詳しくは、英文マニュアル Appendix Dを参照して下さい。

2-4. システムソフトウェアの呼び出しとキーパッド操作

全てのソフトウェアファンクションは、コントロールパネル上のキーパッドで操作されます。キーパッドを使うことでファイルの呼び出し、実行、編集、保存、プリントまた消去ができます。また全てのファイルのインフォメーションは、キーパッド入力によりコントロールパネルのディスプレイに表示されます。

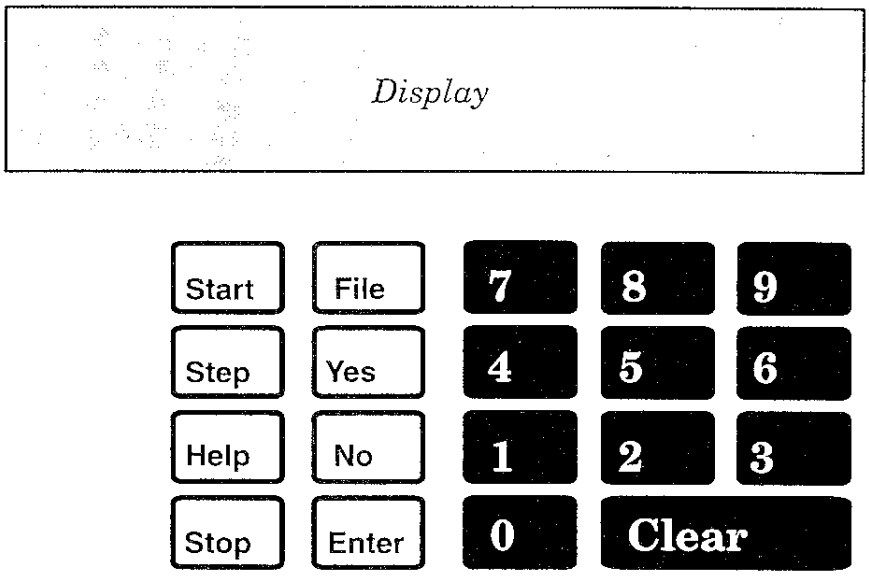


図2-8. コントロールパネル上のキーパッドとディスプレイ

キーパッドを使った主なファンクションとそのディスプレイを図2-9に示します。

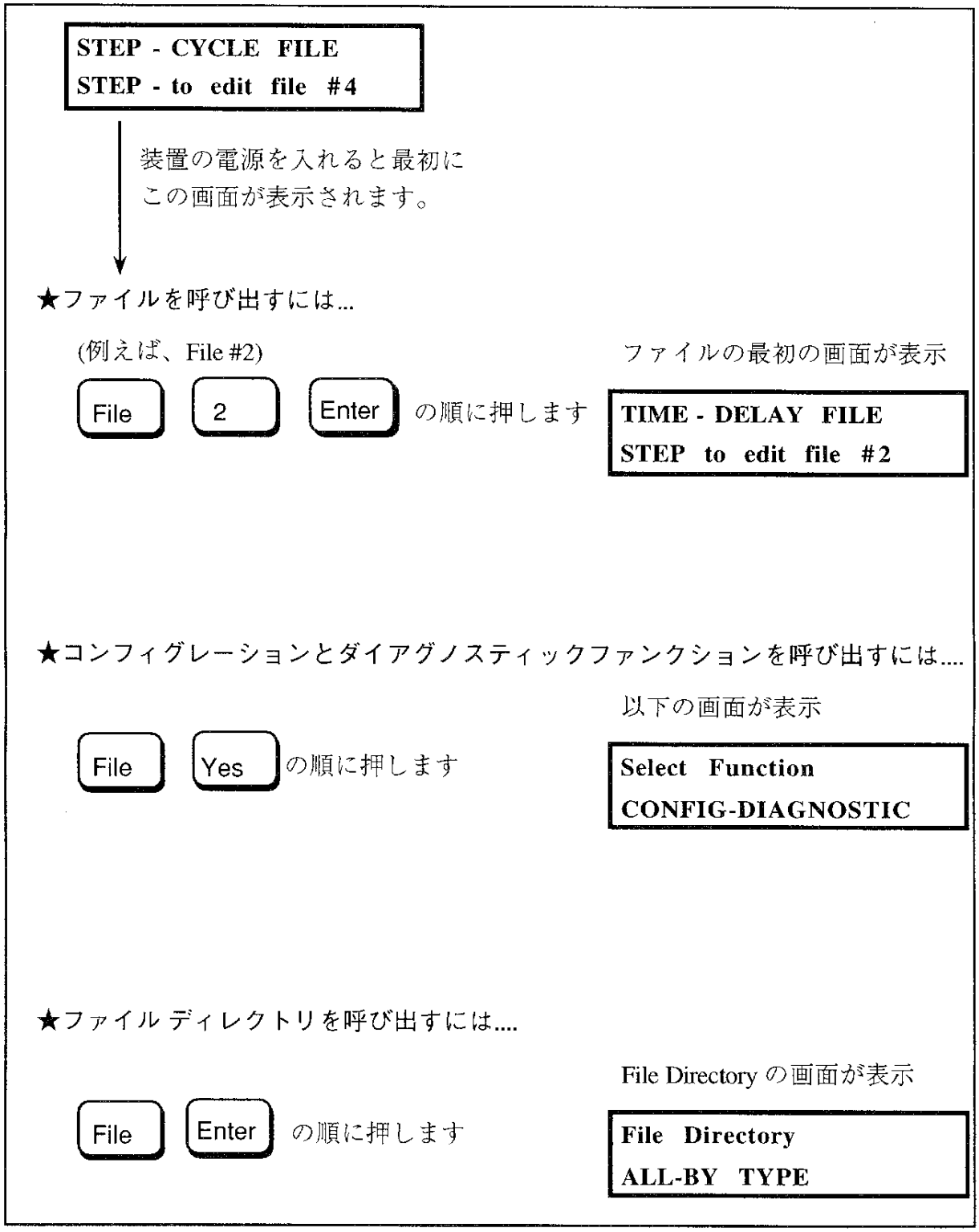


図2-9. 主なソフトウェアファンクションの呼び出し

第3章
PCRメソッドファイルの作成

この章では、Soak FileとStep-Cycle Fileのシステムデフォルト
ファイルの値を変更して、新たにSoak FileとStep-Cycle Fileを設定し、
PCRメソッドファイルを作成する方法について記述します。
この章には、以下の項目があります。

3-1. 基本操作

3-2. プログラムファイル

"Hot Start"とは...
"Storage"とは...

3-2-1. "Hot Start" Soak Fileと"Storage" Soak Fileの作成

<"Hot Start" Soak FileをFile#8として設定する手順>
<"Storage" Soak FileをFile #13として設定する手順>

3-2-2. Step-Cycle Fileの作成

<1段階温度Step-Cycle FileをFile #11として設定する手順>
<2段階温度Step-Cycle FileをFile #12として設定する手順>
これまでに行ったこと

3-2-3. まとめ

3-3. "Hot Start" Soak FileとPCRメソッドの開始方法

3-3-1. "Hot Start" Soak Fileのスタート
3-3-2. PCRメソッドのスタート

3-1. 基本操作

キーパッド操作で、よく使用するファンクションを以下の表にまとめました。

表3-1. キーボードファンクション

以下のことを実行するとき	このキーを押して下さい
ファイルの最初の画面から実行スタート	Start
ファイルの次画面やパラメータを見る デフォルト値や条件を確定したり、 ファイルで次の画面に移りたいとき	Step
ファイルを編集しているときに、前の画面の パラメータを見たいとき ファイルを実行中、２つのrun-time 画面を継ぐ	Help
ファイルを編集中、ファイルの最後の画面に移りたいとき ファイル実行中に一時停止したいとき	Stop
ファイル実行を中止したいとき	Stop Stop
ファイルの呼び出し (例えば、File #4)	File 4 Enter
ファイルディレクトリの呼び出し	File Enter
コンフィグレーションファイルと ダイアグノスティックファイルの呼び出し	File Yes
そのファイルで最初の画面から個々のファイルを消去	File Clear
数値の入力	0 ～ 9 Enter
数値の消去 (まだEnter を押していないとき)	Clear
ハイフン(-)でつながっている選択項目で、 となりの選択項目にカーソルを移動させたいとき	No
カーソルでハイライトにして選択した項目や またはキーパッドから入力した項目を確定	Enter

【キーパッドの基本操作】

◆ ファイル作成中に、入力ミスしたら

- **Stop** キーを２回以上押すことで初期画面に戻れます。
- **Help** キーを押すと前の画面に戻れます。

注　数値を間違って入力したとき

まだ **Enter** キーを押していなければ、**Clear** キーで値を消せます。
Enter キーを押した後間違いに気付いた場合は、**Help** キーを押して一度前の画面に戻って数値を再入力して下さい。

◆ 画面に表示しているデフォルト値をそのまま使うときは
Stepキーか **Enter** キーのどちらかを押して下さい。

◆ カーソルを移動するときは
Noキーにより、隣りの選択肢に移動できます。

◆ 温度と時間は整数値で入力 します。

3-2. プログラムファイル

この章では、まず最初に"Hot Start"用＊と"Storage"用＊のSoak Fileを#8, #13として作成し、次に2種類のStep-Cycle Fileを各々#11,#12として作成します。そして#11→#12→#13の順に各ファイルをリンクしてメソッドファイルを作成します。

注 "Hot Start" Soak File は、メソッドファイルの一部ではありません。

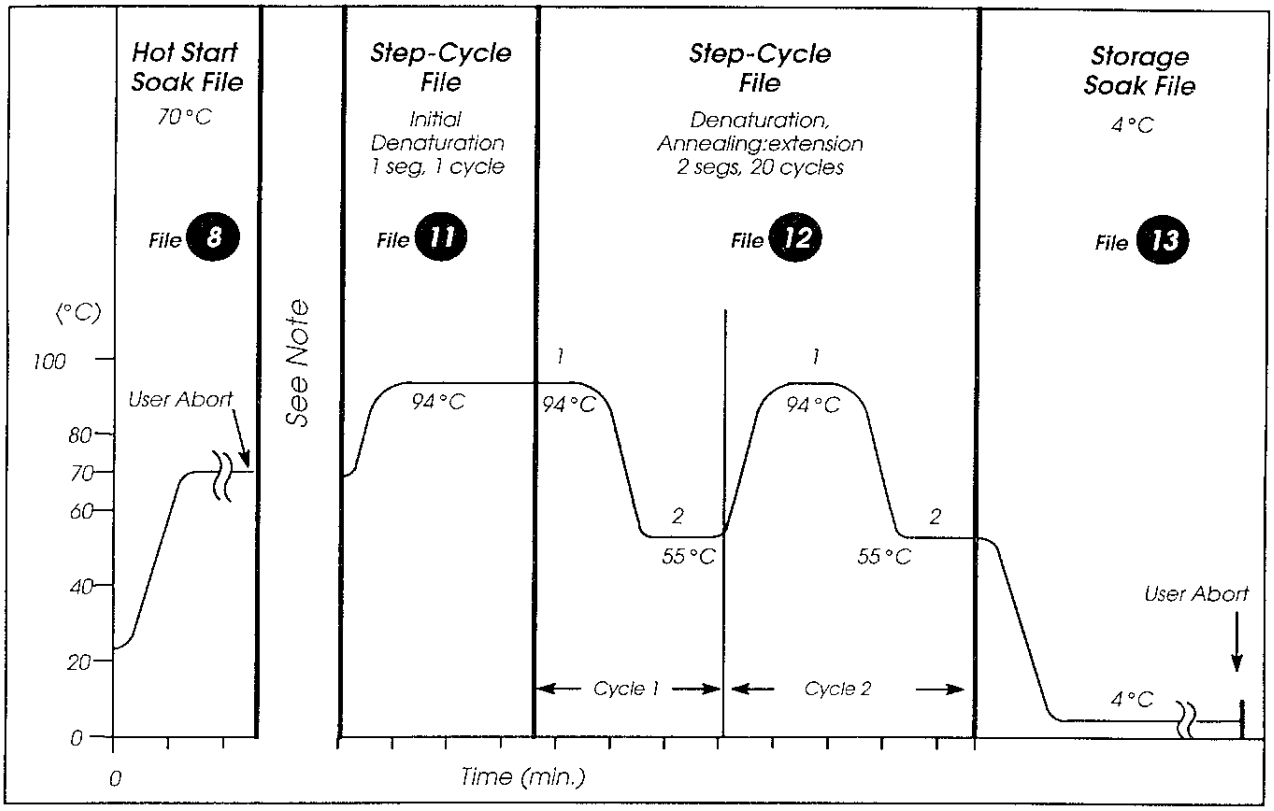


図 3-1. この章で作成するファイルプログラム

＊ "Hot Start" と"Storage"につきましては、次頁をご覧下さい。

"Hot Start"とは...

"Hot Start" とは、サンプルを高温条件におき、サンプル調製時におけるプライマーのミスアニーリング、ミスプライミングを防ぐ手法です。
in situ PCR では細胞をそのままサンプルとするため、それら非特異的PCR産物が出やすくなります。
また、*in situ* PCR の検出方法としてネガ/ポジコントロールと比色によるPCR産物の検定を行うためバックグランドを低減させることは重要な操作です。

本マニュアル中では以下の方法で"Hot Start" を行っています。

(1) AmpliTaq DNAポリメラーゼ, *IS* 以外のPCR 反応液を反応チューブに入れて、65℃のヒートブロックにのせ、少なくとも５分はインキュベートします。

(2) (1)の反応チューブに、AmpliTaq DNA ポリメラーゼ, *IS* を加え、均一に懸濁後、65℃のヒートブロックに戻します。

(3) 70℃に温めたAssembly Tool★上で、サンプル処理したスライドに(2) のPCR反応液をのせてAmpli Cover Disc/Clipアッセンブリー★で封入します。

(4) 1枚のスライドガラスに全てAmpli Cover Disc/Clipアッセンブリーをセットしましたら、すぐに温度を70℃に設定したGeneAmp *In Situ* PCR System 1000のヒートブロックにセットしておきます。
全サンプルをセットし終えてサイクルをスタートさせるまで、ヒートブロックは変性反応温度で保っておきます。

★Assembly Tool, Ampli Cover Disc/Clipアッセンブリーについては、第４章を参照して下さい。

"Storage"とは...

"Storage"は、PCR サイクル終了後、サンプルブロックを4℃に設定することで、酵素の不活性化及びPCRプロダクトの分解防止を目的としています。

3-2-1. "Hot Start" Soak File と"Storage" Soak File の作成

< "Hot Start" Soak File をFile #8として設定する手順 >

Soak File #1 を以下のパラメーターに変更し、ユーザーファイル #8に保存します。

パラメーター

Soak Temperature = 70℃
File # = #8

作成手順

File 、**1** 、**Enter** の順に押します。

Soak File の最初の画面が表示されます。

SOAK FILE
STEP to edit file #1

1. **Step** キーを押して、次の画面に移ります。

Soak Temperature	
(-5 to 100)	**70℃**

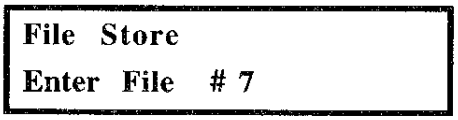
2. 初期値の70℃を使うため、そのまま**Enter** キーを押します。

End of file
RUN - STORE - PRINT

3. これはSoak Fileの最後の画面です。この画面から作成したユーザーファイルを実行したり、保存したり、パラメーターのプリントをすることができます。

4. カーソルの位置は、**RUN**の下にありますので、**No** キーを押してカーソルをSTOREのところに移動させます。

5. 次に **Enter** を押します。



ここに表示されるファイルナンバーは、次のまだ設定されていない一番若いナンバーが表示されます。ユーザーファイルとしては7～99までのナンバーを指定することができます。ここでは、テンキーを使って**8** と入力します。次に**Enter**を押します。

6. ファイルナンバーを入力すると、以下の画面が表示されます。

7. ファイルを保存するために、**Yes** を押します。再びSoak File の最初の画面が表示されます。

次回、この作成したSoak File を再編集したり実行させたりするときは、**File** 、**8** 、**Enter** の順に押します。

< "Storage" Soak File をFile #13として設定する手順 >

Soak File #1 を以下のパラメーターに変更し、ユーザーファイル #13に保存します。

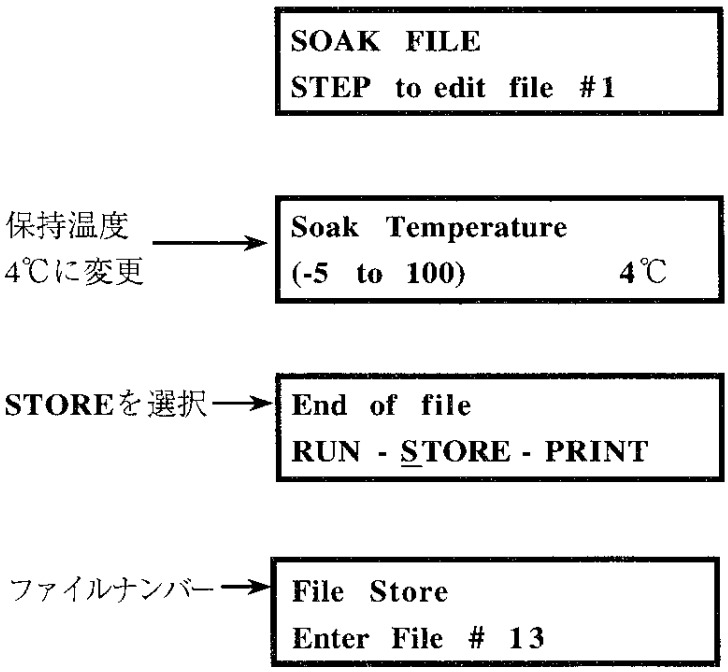
パラメーター

Soak Temperature = 4℃
File # = #13

作成手順

再度システムのデフォルトSoak File を呼び出します。
File 、**1** 、**Enter** の順に押します。

Soak File の最初の画面が現われます。"Hot Start" Soak File と同様に入力し、File #13 として保存してみて下さい。



(今回は13と入力して下さい。これは現在作成中の"Storage" Soak Fileのファイルナンバーです。)

Yesを押します→

Yes to Store
File# 13

3-2-2. Step-Cycle Fileの作成

次にStep-Cycle Fileを２種類作成します。１つは、サイクル前の変性用ファイルで、１種類の時間/温度のパラメーターからなります。もう１つのファイルは、２種類の時間/温度のパラメーターを設定する増幅用のファイルで、変性と伸長ステップに対応します。

注　Step-Cycle File は、パラメーターの設定をするセグメントと、**終結セグメント**と呼ばれる設定点の終了を意味するセグメントからなります。これは温度、時間共に0 ℃、0分0秒と入力することで認識します。
従って1セグメントのStep-Cycle Fileの場合、２番目のセグメントが終結セグメントになります。また２段階温度 PCRの場合、３番目のセグメントが終結セグメントになります。

<1段階温度 Step-Cycle File をFile #11として設定する手順>

Step-Cycle File #4 を以下のパラメーターに変更し、ユーザーファイル #11 として保存します。

パラメーター

Segment #1 : Temperature =	**94℃**
Time =	**2 min. 30 sec.**
Auto Segment Extension =	**No**
Cycle Count =	**1**
Link to File =	**#12**
File # =	**#11**

作成手順

デフォルトの Step-Cycle File を呼び出します。

キーを **File**、**4**、**Enter** の順に押します。

Step-Cycle File の最初の画面が現われます。

```
STEP-CYCLE  FILE
STEP  to edit  file  #4
```

1. **Step**キーを押してセグメント #1 の温度を設定すると、次の画面に移ります。

```
Seg  1      Target  Temp
( -5  to  100)        94℃
```

デフォルトのStep-Cycle 温度 の94 ℃が画面に表示されます。ここではデフォルトの94℃をそのまま使うため、**Step** キーを押して、次の画面に移ります。

```
Seg  1     Segment  Time
( 0 - 999 )    1min  0sec
```

2. カーソルはmin の入力位置にありますので、0～999 の範囲で入力します。
ここではテンキーを使って **2** を入力し、**Enter** を押すとカーソルは sec に移動しますので、0～59の範囲で入力します。

Seg 1 Segment Time
(0 - 59) 2min 0sec

3. ここでは、テンキーを使って sec を **30** に変更し、 **Enter** を押します。

Seg 1 Segment Time
(0 - 59) 2min 30sec

新しい値の入力が完了しますと、セグメント#2の画面になりますので、終結を示すセグメントを入力します。終結セグメントは温度、時間ともにゼロを入力して下さい。

終結セグメント→

Seg 2 Target Temp
(-5 to 100) 0℃

4. テンキーを使ってセグメント #2の設定温度を 0 ℃に変更し、**Enter**を押すと、以下の画面が表示されます。

終結セグメント→

Seg 2 Segment Time
(0 - 999) 1min 0sec

5. セグメント #2に、セグメント #1 のステップ 2. , 3.と同じ方法で、時間もすべて **0**に変更後、**Enter**を押して次の画面に移ります。

Auto Seg. Extension
NO - YES

6. 自動延長機能はセグメントを連続延長するオプションです。
このオプションの詳細につきましては、英文マニュアル
Appendix A を参照して下さい。通常はNOの状態（自動延長機能
を使用しない）で、そのまま**Enter** を押しますと、次の画面が
表示されます。

Cycle Count
(1 - 99)　　25

7. これはサイクル数を入力する画面です。デフォルト値は25になって
います。最初の変性用サイクルなのでカウント数を **1** に変更し、
Enterを押します。

リンクするファイルナンバー

Link to stored file
(0-99, 0=SHUT-OFF) 0

この画面は、メソッドを作成するとき、Step-Cycleを他のファイル
と連結させるためのものです。デフォルト値の０は連結させずに
終了させることを意味します。デフォルト値のままにしておきま
すとブロック温度のコントロール終了後、温度は徐々に室温に
戻ります。

8. 今回は、File #12 への連結を予め入力しておきます(P37 "重要" 参照)。
テンキーを用いて12を入力し、**Enter**を押して下さい。

重要　**未設定ファイルへのリンク** まだFile #12を作成していなく
てもシステムはメソッド作成中、リンクする予定のまだ実在
しないファイルナンバーの入力を一時的に許可します。
２段階温度のStep-Cycle File、File #12は、この後で作成します。

9. Step - Cycle Fileの最後の画面が表示されます。

End of file
RUN - STORE - PRINT

10. カーソルを**No**キーで**STORE**にあわせて、**Enter** を押します。

File Store
Enter File #

この画面にはまだ設定されていない一番若いファイルナンバーがデフォルトとして表示されます。

テンキーを使って**11** に変更後、**Enter** を押します。

11. ファイルナンバーを入力すると以下の画面が表示されます。

Yes to Store
File# 11

12. ファイルを保存するために **Yes** を押して下さい。
これでStep-Cycle File における作成操作が終了し、再び
Step-Cycle File の最初の画面が表示されます。

<2段階温度 Step-Cycle FileをFile #12として設定する手順>

２セグメントStep-Cycle Fileを作成する手順は、アニーリング/伸長セグメントを追加することを除いては、この前に作成しました１セグメントファイルと同じです。しかし終結セグメントは、セグメント２の代わりにセグメント３に入れて下さい。
そしてサイクル回数は、20サイクルと入力して下さい。
画面と入力事項を以下に要約します。

パラメーター

Segment #1 : Temperature =	**94℃**
Time =	**0 min. 40 sec.**
Segment #2 : Temperature =	**55℃**
Time =	**1 min. 30 sec.**
Auto Segment Extension =	**No**
Cycle Count =	**20**
Link to File =	**#13**
File # =	**#12**

作成手順

変性温度 (デフォルト値のまま) →

Seg 1	**Target**	**Time**
(-5 to 100)		**94℃**

変性時間を 0min, 40secに変更 →

Seg 1	**Segment**	**Time**
(0 - 999)	**0min**	**40sec**

アニーリング/伸長温度 55℃に変更 →

Seg 2	**Target**	**Time**
(-5 to 100)		**55℃**

アニーリング/
伸長時間
1min,30secに変更 →

Seg 2 Segment Time
(0 - 999) 1min 30sec

終結セグメント →
温度および時間を
0 に変更

Seg 3 Target Time
(-5 to 100) 0℃

Seg 3 Segment Time
(0 - 999) 0min 0sec

NOを選択 →
(デフォルトのまま)

Auto Seg. Extension
NO - YES

20 cycleに変更 →

Cycle Count
(1 - 99) 20

リンクするファイル
ナンバー →

Link to stored file
(0-99, 0=SHUT-OFF) 13

(今回は13と入力して下さい。File #13は、この章のP32で作成した "Storage"Soak Fileです。)

Storeを選択 →

End of file
RUN- STORE-PRINT

ファイルナンバー→

File Store
Enter File # 12

(今回は12と入力して下さい。これは現在作成中のStep-Cycle Fileのファイルナンバーです。)

Yesを押します→

Yes to Store
File# 12

以上で 図3-1でデザインしたメソッドの各ファイルは、全て作成されました。
もう一度この章を読み直して確認して下さい。

これまでに行ったこと

この章では、デフォルトファイルを呼び出してそのパラメーターを変更し、別のファイルナンバーに保存しました。またユーザーファイル作成において、そのファイルの次に実行したいファイルナンバーを入力することで、ファイルとファイルをリンクして、１つのPCRメソッドを作ることができました。

以上のことよりユーザーファイルを作成する時に、鍵となる2つの"ファイルナンバー"を以下にまとめました。

◆ ファイルをリンクするためのファイルナンバー

実行しているファイルが終了すると、自動的に次の実行したいファイルナンバーにリンクされます。
またファイル作成時、まだ作成していないファイルにリンクすることができました。
リンクするファイルは必ずしも、実行するファイルナンバーの次のナンバーにリンクする必要はありません。
(例 ： File #20からFile #12にリンクできます。)

◆ ユーザーファイルナンバー

File #1～4 のデフォルトファイルの条件を変更したものを保存できるファイルナンバーです。

注１ Time-Delay File とThermo-Cycle Fileも、上記のように２つのファイルナンバーを指定します。これらのファイルについての説明は、英文マニュアルのAppendix Aに記述されています。

注２ Soak Fileは、Stop キーを押すまで設定温度を保持するため、他のファイルにリンクすることはできません。

3-2-3. まとめ

この章の初めに、"Hot Start "Soak File を作成しました。このファイルは、*in situ* PCRで"Hot Start "を行っている時に使用し、全サンプルをサンプルブロックにセットし終えるまで70℃を保持します。実際の*in situ* PCRメソッドは1サイクル、1セグメントの最初の変性用ファイルであるFile #11 から実行します。そして2セグメントStep-Cycle File のFile #12にリンクされます。
File #12が終わりますとFile #13 の"Storage" Soak Fileにリンクされます。
ファイルがどのような順番でリンクされるかを図3-2に示しました。

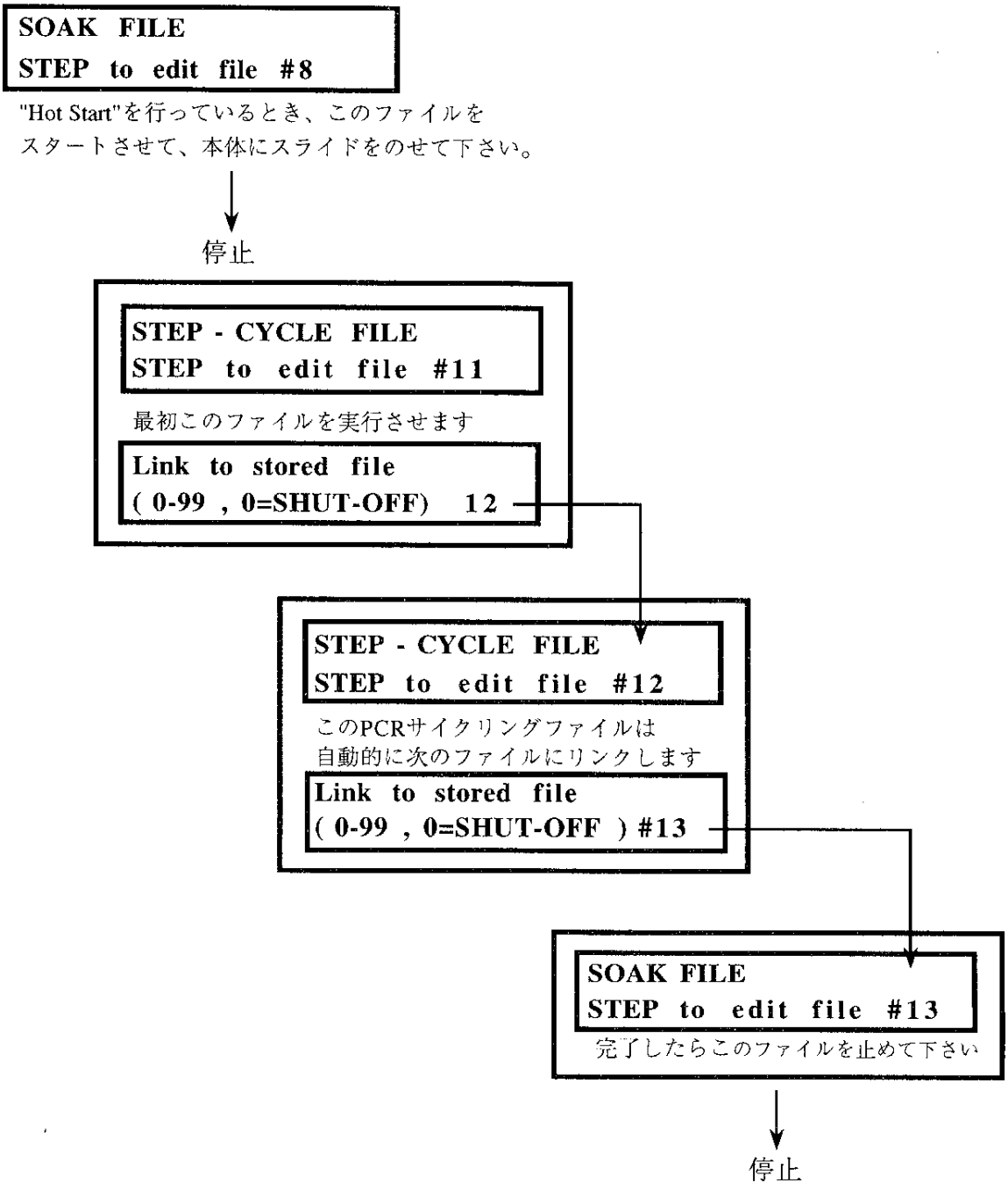


図3-2. ファイルリンクのチャート

3-3. "Hot Start" Soak FileとPCRメソッドの開始方法

"3-2. プログラムファイル" で作成したファイルを使って、PCRメソッドを開始するための操作を例に行ってみます。
ここで行うのは、操作の練習なので、空運転で行います。
サンプルはまだ本体にセットしないで下さい。
まず、"Hot Start" Soak File #8 を実行します。しばらくしてから Soak Fileを終了させます。続いてメソッドのFile#11をスタートさせます。File #11が終了しますと、自動的にFile #12 がスタートします。File #12が終了すると、自動的に今度はStopキーを押すまで4 ℃を保持し続ける "Storage" Soak File #13にリンクされますので、File #12 を1～2サイクル実行したら止めてください。なお、実際にサンプルをのせるときの詳しい手順につきましては、第4章をご覧下さい。

3-3-1. "Hot Start" Soak Fileのスタート

" 3-2-1. "Hot Start" Soak File と"Storage" Soak Fileの作成" で作成した Soak File #8 を以下の手順で実行します。

File、**8**、**Enter** の順に押します。

画面に指定したファイルナンバーが表示されます。

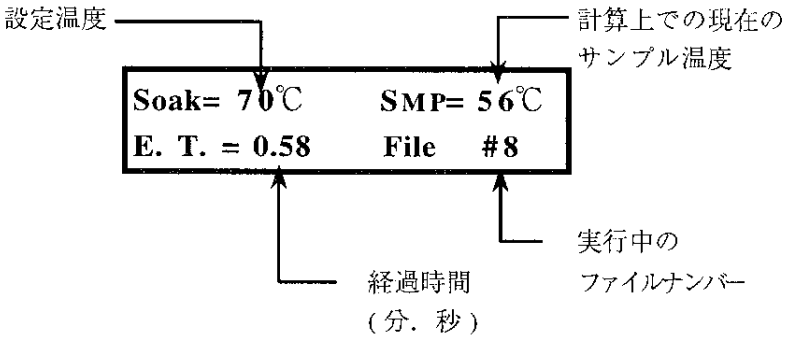
SOAK FILE
File #8

1. **Start**キーを押します。プリンターを設定している場合、次の画面が現われます。

Select Print Mode
OFF-ON

2. プリンターを使用しない場合、初期値(OFF)のまま**Enter**を押して下さい。

3. Soak File がスタートします。正面のパネルの" Heating " 表示が点灯します。(ブロックが設定温度に達するとすぐに、表示ライトが点滅します。)そして以下の実行画面が表示されます。
この画面の表示は連続して更新されます。



4. 経過時間はSoak Fileがスタートしますと、カウントアップします。"Hot Start" Soak Fileスタート時、サンプルブロックが室温(～22℃)である場合、サンプル温度(SMP)が70℃に到達するまでに約２分かかります。

5. これを終了するために**Stop**キーを押して下さい。以下の画面が表示されます。

ABORT File?
Press STOP or START

この画面は実行を中断させるときや、一時中断後、再スタートさせるときに使用します。

6. 再度**Stop**キーを押すとSoak Fileは中断され、最初の画面に戻ります。

SOAK FILE
File #8

本来なら70℃に到達したところでサンプルをセットしますが、ここでは操作の練習なので、サンプルはセットしません。

次に、メソッドを実行するために、" 3-2-2. Step-Cycle File の作成 " で作成したStep-Cyle File #11をスタートさせます。

警告

ファイル終了後、何も操作しなければブロックは冷却されませんので、"Hot Start" Soak File 実行中やメソッドを始めるとき、ブロックは熱いままになっていますので注意して下さい。
なお、次のファイルのスタート等の操作をすれば、冷却器が働き始めます。

3-3-2. PCR メソッドのスタート

File、**11**、**Enter** の順に押します。

画面に指定したファイルナンバーが表示されます。

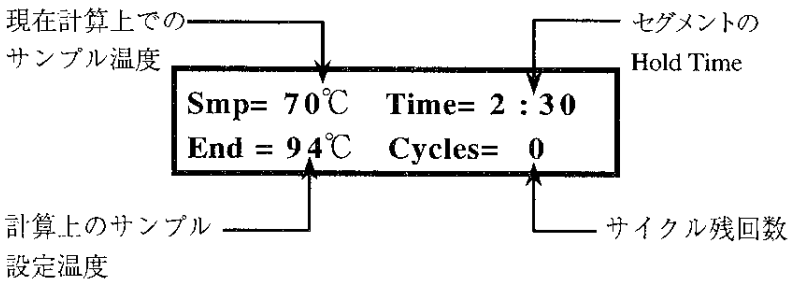
STEP-CYCLE FILE
File #11

1. **Start**キーを押します。プリンターを接続している場合、
   次の画面が現われます。

Select print mode
OFF-ON

2. プリンターモードをOFFのまま**Enter**を押して下さい。

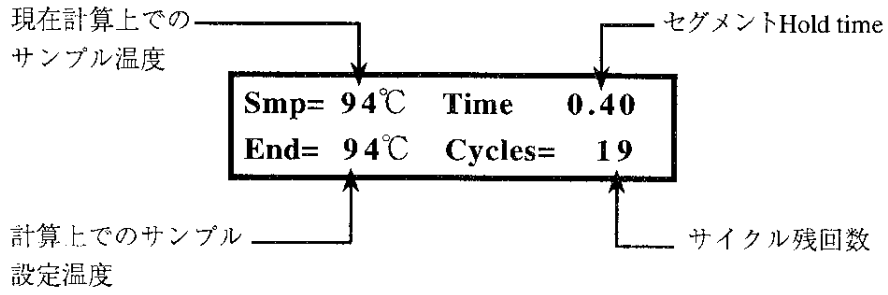
3. Step-Cycle File がスタートします。正面のパネルの" Heating "
   表示が点灯します。
   (ブロックが設定温度に達するとすぐに、表示ライトが点滅します。)
   そして以下の実行画面が表示されます。この画面表示は連続して、
   更新されます。



そのセグメントの Hold time は、設定温度にある程度まで達する
とカウントダウンします。

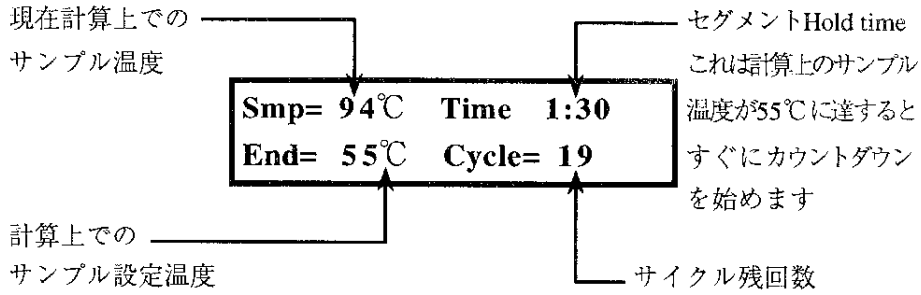
このファイルは1サイクル・1セグメントのStep-Cycle File なので、
カウント残回数は 0を表示しています。

4. このStep-Cycle File #11 が終了すると自動的に次のStep-Cycle File #12がスタートし、以下の画面が表示されます。

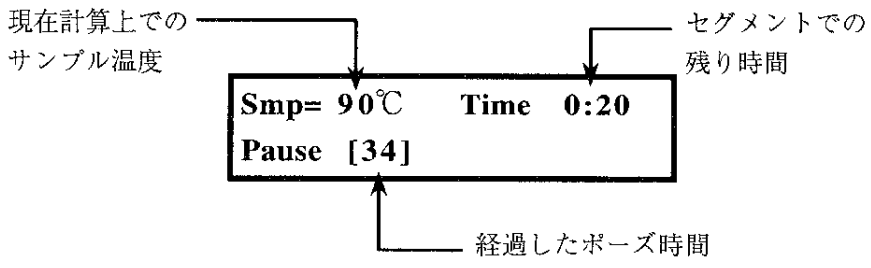


この画面は、File #12 の最初のサイクルの最初のセグメント(変性用)のパラメーターです。

5. 変性用セグメントが終了しますと、セグメント２のパラメーター、アニーリング / 伸長用セグメントが表示されます。



6. 数サイクルを観察した後、**Stop**キーを押してファイルを終了して下さい。以下の画面が現われます。



この画面は**Stop**キーを押すと、そのセグメントの残り時間がTimeに表示します(この場合20秒)。Pause フィールドには、ポーズしてからの経過時間が **Pause [x]** に表示され、ブザーが鳴り続けている間デフォルト値の99秒までカウントアップします。そして、99秒後自動的にプログラムは終了します。

7. 再度**Stop**キーを押すと、以下の画面が表示されます。

ABORT File?
Press STOP or START

8. **Stop**キーを押して、中止します。Step-Cycle Fileの最初の画面が現われます。

STEP-CYCLE FILE
File #12

これで完了です。

実際にサンプルスライドを作成し、本体にセットした後のスタートランの手順につきましては、次章の" 4-5. スタートラン "を実行して下さい。

第4章

In Situ PCRスライドのセット

この章では、*In Situ* PCRスライドにサンプルをセットするために必要な、システムの使用方法とスタートランについて説明します。この章には以下の項目があります。

4-1. サンプルスライドの前準備
- 4-1-1. 準備するもの
- 4-1-2. 作業環境の準備

4-2. スライドでのサンプルの位置
- サンプルが中央から外れてしまったとき
- サンプルが互いに近接している
- 3サンプルより少ない場合

4-3. AmpliCover Clip / Discアッセンブリーの取り付け
- 4-3-1. サンプルポジション1
- 4-3-2. サンプルポジション2と3

4-4. 本体へのセット

4-5. スタートラン
- < "Hot Start" Soak File の中止 >
- < メソッドのスタート>

4-6. AmpliCover Clip / Discアッセンブリーの外しかた

4-1. サンプルスライドの前準備

4-1-1. 準備するもの

サンプルスライドの作成を始める前に以下のものが揃っているか確認して下さい。

- ☐ GeneAmp *In Situ* PCR System 1000 (Part No.: N804-0003 [100VAC, 50/60Hz])
- ◆☐ Assembly Tool (Part No.: N804-0100)
- ◆☐ AmpliCover Discs (Part No.: N804-0500)
- ◆☐ AmpliCover Clips (Part No.: N804-0501)
- ◆☐ *In Situ* PCR Glass Slides (Part No.: N804-0502)
- ◆☐ Disassembly Tool (Part No.: N804-0022)
- ☐ P10,P100,P200 ピペットマン(Reinin/Oxford),あるいは同等品
- ☐ ヒートブロック 1 台 (0.2,0.5,1.5 ml チューブが使えるもの): 65℃ "Hot Start" 用
- ☐ GeneAmp PCR Reaction Tubes (Part No.N801-0280 or N801-0180)
- ☐ GeneAmp *In Situ* PCR Core Kit (Part No.N808-0197)

◆マークがついたものは、GeneAmp *InSitu* PCR System 1000専用のアクセサリーです。詳細につきましては、英文マニュアル第 3 章を参照して下さい。

4-1-2. 作業環境の準備

サンプルをセットするために、必要なものが全て揃っているか
以下の項目を確認して下さい。

1. Assembly Tool が GeneAmp *In Situ* PCR System 1000のすぐ近くに置いてあるか確認して下さい。

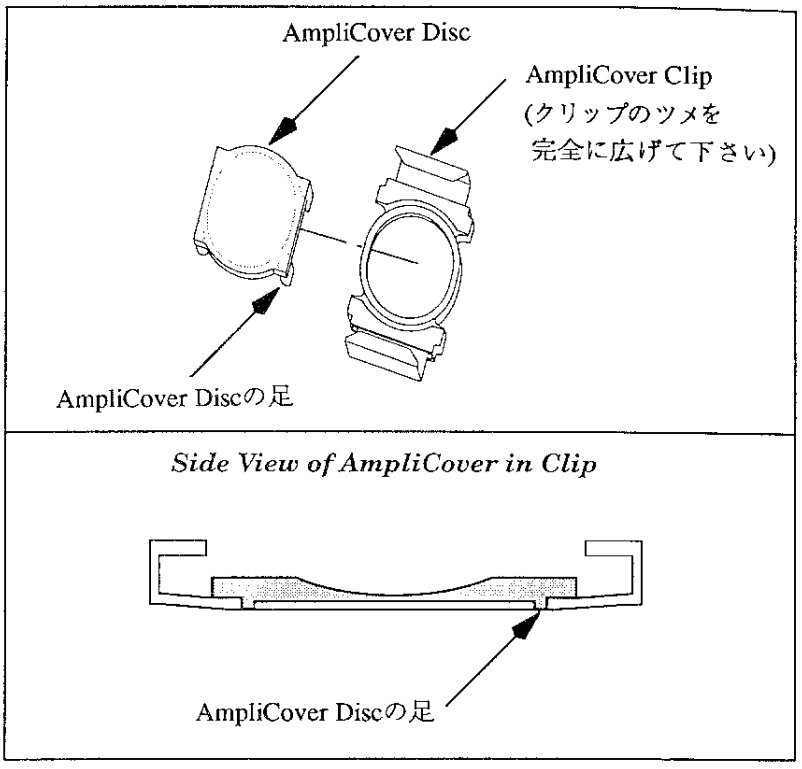
2. 必要な検体数を決めて下さい。

3. どのファイルを実行するかを決めて下さい。
   典型的な*in situ* PCRメソッドの実行に必要なSoak FileとStep-Cycle Fileのプログラム作成方法は、本マニュアルの第３章を参照して下さい。

4. 手袋を装着し、表面が乾いたきれいな台の上に、必要な数のAmpliCover DiscとAmpliCover Clipを用意します。下図に示したようにAmpliCover Clipのツメを完全に広げ、AmpliCover Clipの内側にAmpliCover Discをしっかりと取り付けます。

重要　最良の結果を得るために、AmpliCover Discs とAmpliCover Clips、*In Situ* PCR Glass Slidesを扱うときは、手袋を使って下さい。

5. ピペッターを用意します。



"Hot Start"を行う場合、以下の項目も確認して下さい

6. "Hot Start" を実行するときは、ヒートブロックの温度設定が65℃になっていることを確認して下さい。

7. Assembly Tool の電源を入れて、前もって温度を70℃に暖めて下さい。
グリーンの光が点滅しているときは70℃に保たれています。

8. "Hot Start" Soak Fileをスタートし、サンプルブロックを70℃にセットして下さい。装置が室温(~22℃)にあるとき、到達するまで約2分かかります。

   "Hot Start" Soak File のスタート手順は、P45の「3-3-1. "Hot Start" Soak File のスタート」を参照して下さい。

9. AmpliTaq DNA ポメラーゼ, *IS* 以外のPCR反応液を、0.5mlの反応チューブに入れて、65 ℃のヒートブロックにのせ、10 の操作を実行するまでに、少なくとも 5 分はインキュベートして下さい。なお、シリコン処理している反応チューブは使用しないで下さい。

10. 反応チューブ0.5mlにAmpliTaq DNA ポメラーゼ, *IS*を加え、均一に懸濁後、65℃のヒートブロックに戻します。

このチェックリストに記した操作が終了しましたら、

すぐに"4-3. AmpliCover Clip/Discアッセンブリーの取り付け"を行って下さい。

4-2. スライドでのサンプルの位置

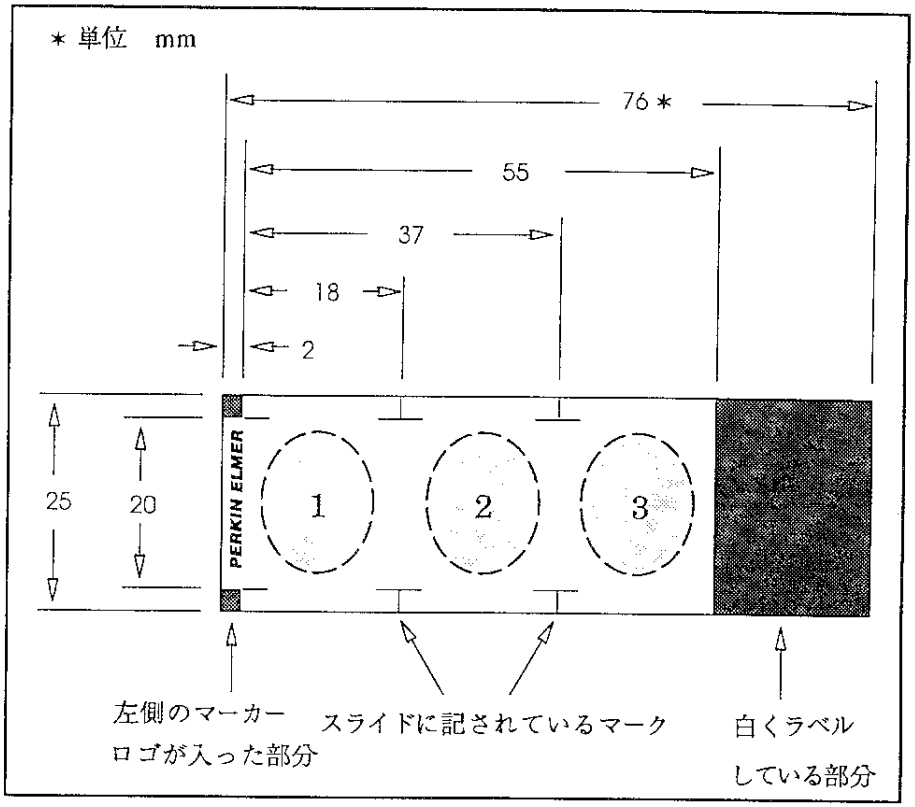


図 4-1 . スライドの形状と組織 /細胞をのせる領域 (実物大)

重要　３つのサンプルを最適な範囲にのせられなくても、３サンプルすべて*in situ* PCRを実行することができます。この例として、図 4-2と図 4-3を参照して下さい。
また、3サンプルのせない場合、左の*PERKIN ELMER*ロゴの部分と右側の白い部分を除いた領域、即ちスライドの透明な部分(上図では55の範囲)の範囲ならどこでもAmpliCover Clip / Discアッセンブリーを取り付けることができます。

サンプルが中央から外れてしまったとき

たとえ個々のサンプルがAmpliCover Clip / Discアッセンブリーでカバーした領域の中心から外れていても、PCRを行うことはできます。しかし増幅できるのは、図 4-2のように、AmpliCover Clip / Disc アッセンブリーの内部のみになります。

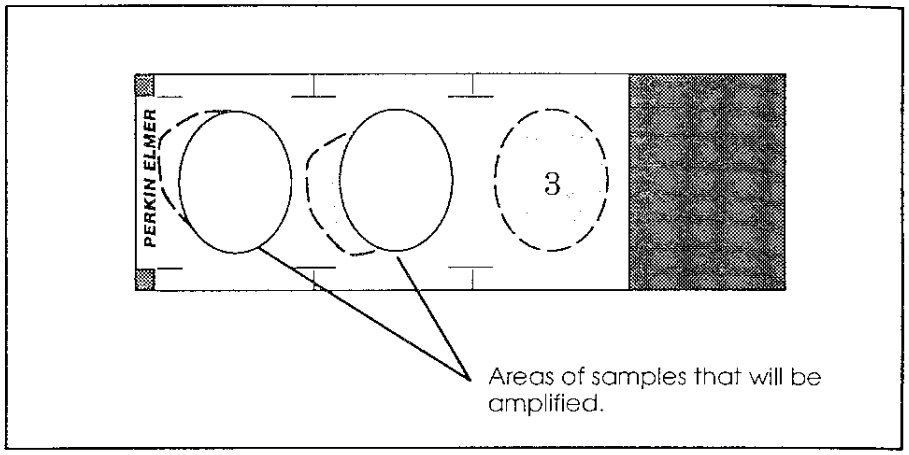


図 4-2. サンプルが中心から外れたときに増幅される領域

サンプルが互いに近接している

図 4-3のように、２つのサンプルが非常に近接していてもPCRを行うことができます。しかしカバーから外れたサンプルは増幅できません。

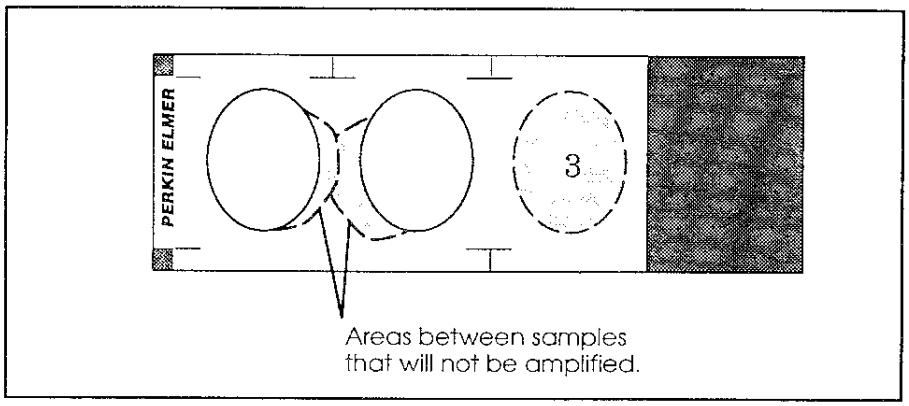


図 4-3. サンプルがカバーから外れたときに増幅しない領域

重要 AmpliCover Clip / Disc アッセンブリーでカバーするとき、カバーが隣のサンプルにかからないようにして下さい。一枚のスライドで３サンプル処理するときは、スライドに記されているマーク (⊥)を参考にして隣の領域に、サンプルが広がらないように注意して下さい。

3サンプルより少ない場合

スライドに固定したサンプルが3つより少なければ、図4-4で表わした領域内のどこにでもAmpliCover Clip / Disc アッセンブリーを取り付けることができます。

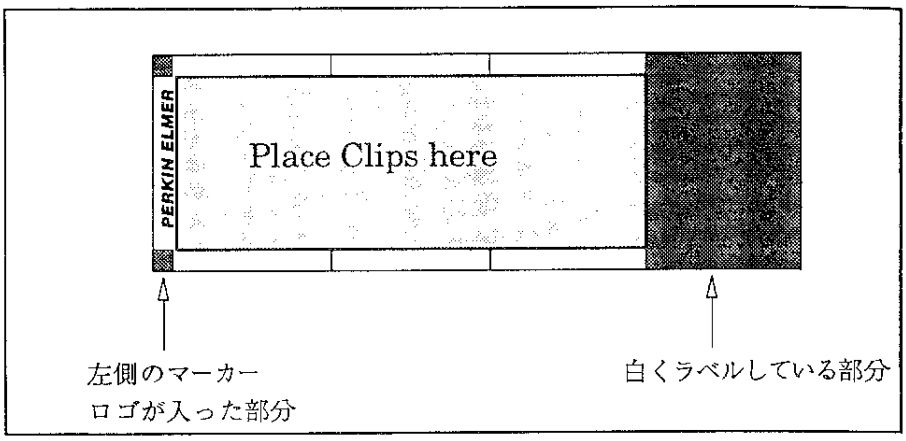
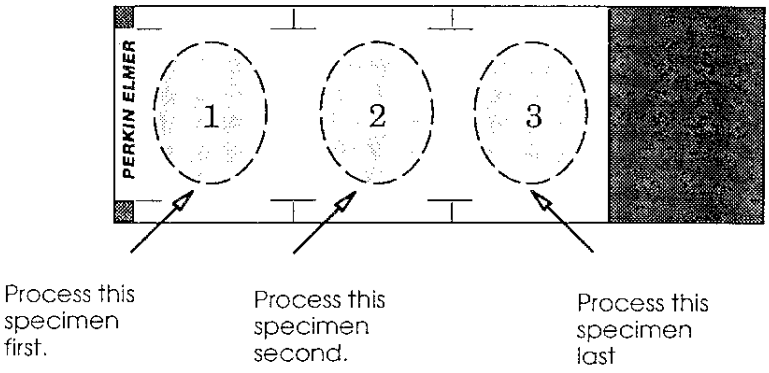


図4-4. サンプルが3つより少ないときのAmpliCover Clip/Disc アッセンブリーを取り付けられる範囲

4-3. AmpliCover Clip/Discアッセンブリーの取り付け

AmpliCover Clip / Discアッセンブリーをスライドにセットするとき、
サンプルは 1→ 2→3 と左端から順にセットして下さい。



"Hot Start"を実行している場合、AmpliCover Clip/Disc アッセンブリーを付け終わりましたら、素早く加熱してあるGeneAmp *In Situ* PCR System 1000へ移して下さい。

Assembly Tool とAssemly Tool プラットホームの真上から見たところを図 4-5に示します。

4-3-1. サンプルポジション 1

1. 図 4-5 に示したように、Assembly Tool コンプレッション・アームが上がっているか確認して下さい。

2. スライドをプラットホームの上にセットします。

警告 "Hot Start"を実行している場合、Assembly Tool プラットホームは70℃になっています。スライドをプラットホームにのせるとき、気を付けて下さい。

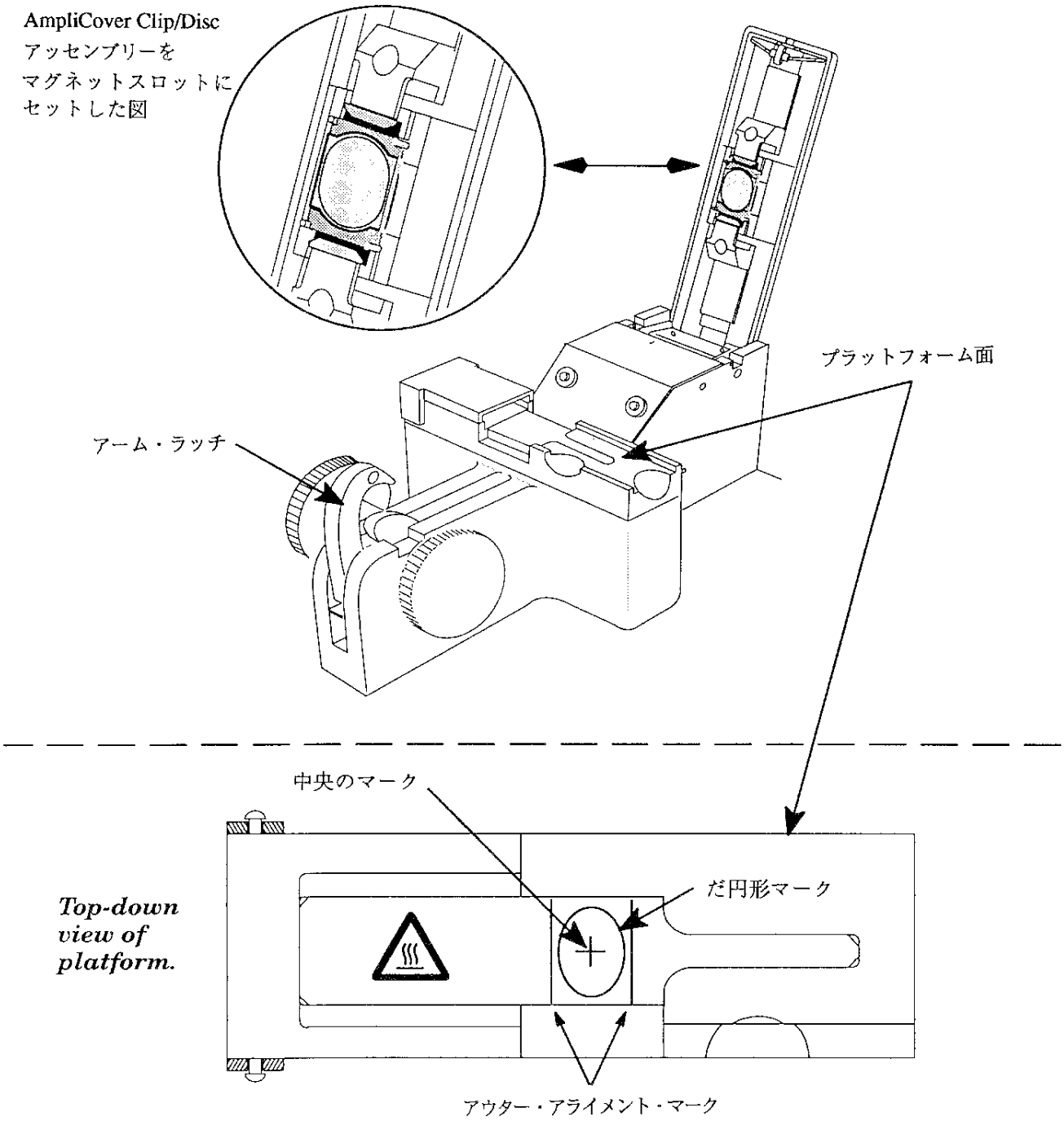
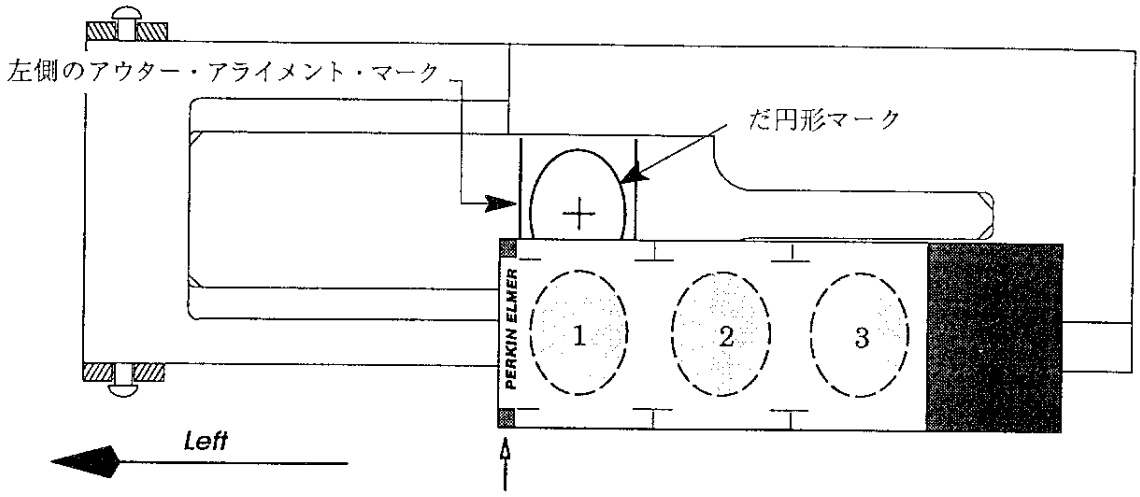


図 4-5. Assembly Tool とプラットホームを真上から見た図

3. スライドに書かれてある*PERKIN ELMER*ロゴを下図に示したプラットホーム上の左側のアウター・アライメント・マークにきっちりと合わせて下さい。

注　図には、スライドとプラットホームは上下にずらして表示していますが、実際は、スライドをプラットホームの真上にセットします。プラットホーム上のアライメント・マークとだ円形マークと、サンプルとの相対位置が図中に示されています。



左側のマーカーと　*PERKIN ELMER*ロゴの部分

4. "Hot Start"を実行している場合、プラットホームの面にスライドをのせて約30秒温めておく必要があります。

5. Assembly Toolのコンプレッション・アームのマグネットスロットに(図4-5)、AmpliCover Discのついた AmpliCover Clipをセットします。AmpliCover Discが、装着されていない面をアームのスロットにくっつけて下さい。AmpliCover Clipの正しい向きは、図4-6に示します。

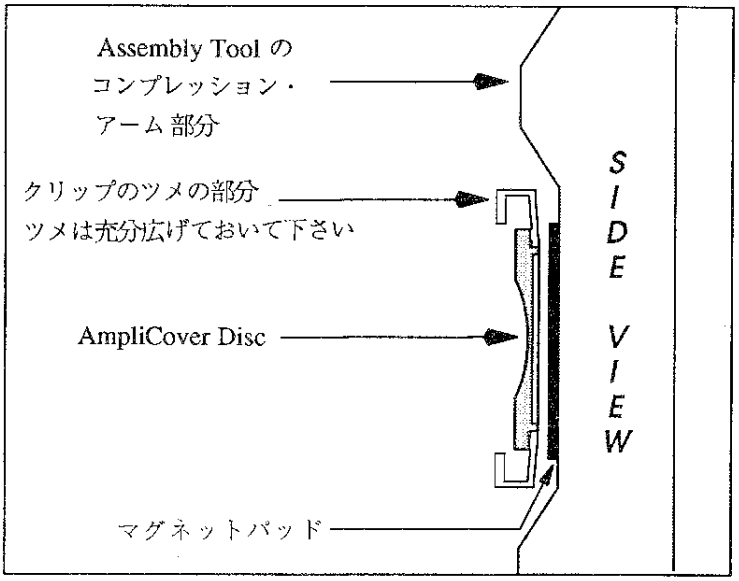


図4-6. AmpliCover Clip/Discアッセンブリーをマグネットスロットにセットしたときの側面図

6. ピペットのチップがサンプルに触れないように注意しながら、PCR反応液50 μ lをスライドにのせます。組織スポットの上で反応液が半球状になるようにゆっくりのせて下さい。
   また、ピペットのチップで気泡ができないよう注意して下さい。

重要 "Hot Start" を行っている場合、反応液(50μl)を取り出すまで反応チューブは65℃に保って下さい。

重要 組織サンプルが多少だ円形マークの中心から外れていたとしても、反応液はだ円形のマークの中心にのせるようにして下さい。

7. 図4-7を参照して下さい。コンプレッション・アームをスライドにのせた反応液のポジションの上にほぼ水平になるまで引き下ろし、Assembly Toolの正面向かって下の方にあるアーム・ラッチに引っ掛けます。

   この操作を行うときは慎重かつ静かに行って下さい。ためらったり、アームを再度持ち上げたりすることは避けて下さい。また、アームは落とさないようにして下さい。ここで重要なことは、AmpliCover DiscがPCR反応液の真上にくるようにすることです。

8. コンプレッション・アームをロックするために、コンプレッション・アーム・ノブをAssembly Tool の後方に向かってゆっくりと回します。回転させる方向は、図 4-7をご覧下さい。

重要 コンプレッション・アーム・ノブを素早く回転させると気泡が入る恐れがあります。気泡が入ってしまうとその周りが増幅されないことがあります。

9. コンプレッション・アームの上に付いている 2 つのスライディンク・ハンドル(図 4-7)をつまみます。
これによってスライドの下で AmpliCover Clipのスライディング・グリップが押され、スライドにAmpliCover Discを固定します。

10. スライディング・ハンドル から手を離し、ノブを手前に 回して元の位置に戻します。

11. コンプレッション・アームを元の正しい位置に戻します。

注 ステップ８で、過剰量の反応液が AmpliCover Clipの外に漏れますが、これは正常です。またこの漏れた反応液をキムワイプで吸い取ってもかまいません。この操作を行うとき、吸い取っている間もスライドはプラットホームに置いたままで行ってください。また過剰の溶液が隣りのサンプルを汚染しないように注意して下さい。

これでサンプルポジション 1 のAmpliCover Clip / Disc アッセンブリーの取り付けが完了しました。

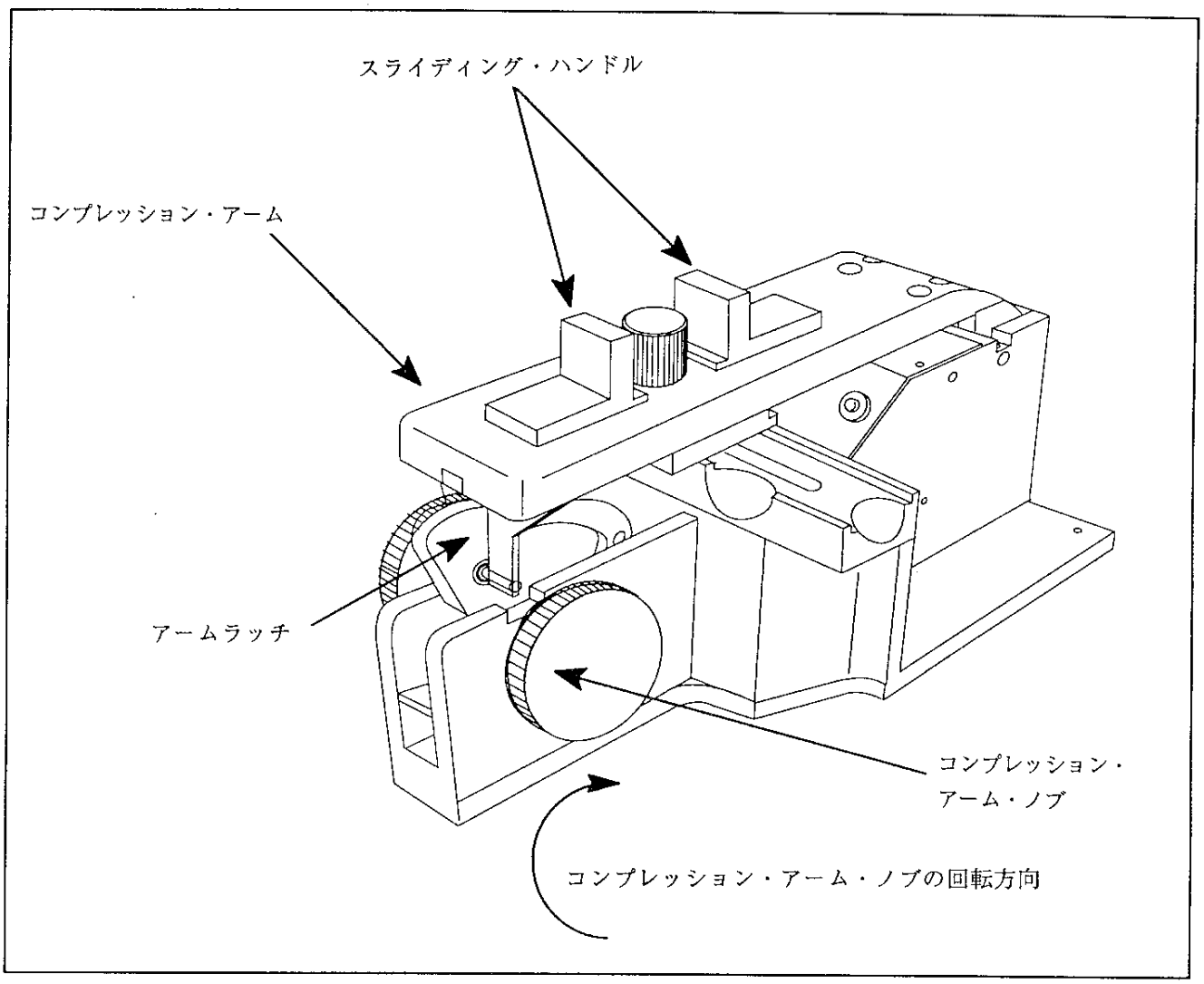
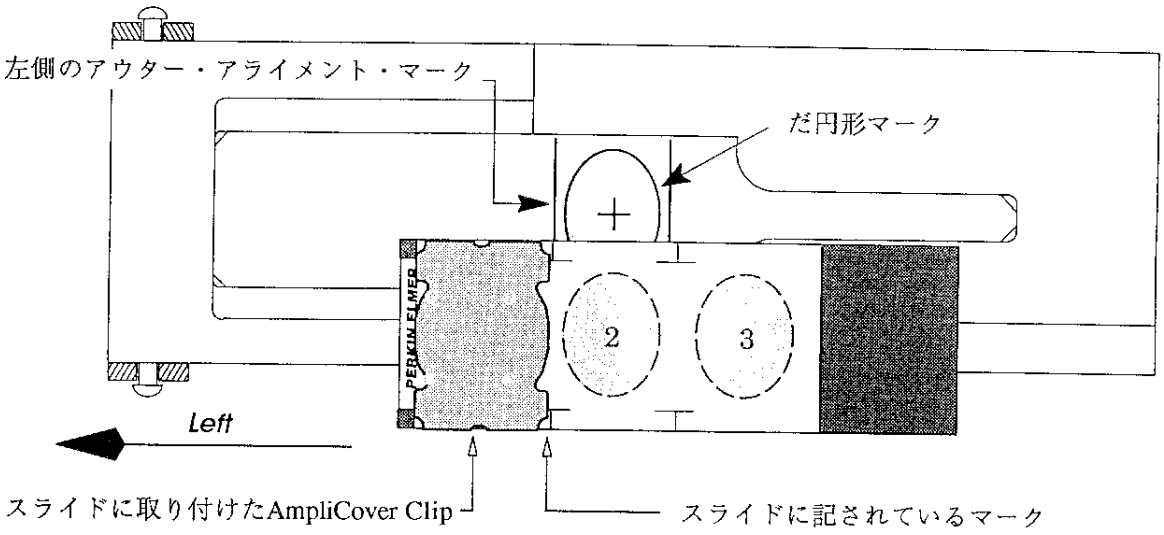


図 4-7. スライドへAmpliCover Clip / Discアッセンブリーを固定する方法

4-3-2. サンプルポジション２と３

次にサンプルポジション２と３へAmpliCover Disc / Clip アッセンブリーの取り付け手順を記述します。

1. ポジション１のAmpliCover Clipの右端がプラットホームの左側のアウター・アライメント・マークと合うように、スライドをプラットホーム上で左にずらします。スライドに記されているマークを、下図のように左側のアウター・アライメント・マークに必ず合わせて下さい。



2. サンプル２と３も、サンプル１と同様に"4-3-1. サンプルポジション１"のステップの５～11を繰り返します。

3. AmpliCover Clip / Disc アッセンブリーを全て付け終えましたら、"4-4. 本体へのセット"へ進んで下さい。

重要 "Hot Start"を実行している場合、GeneAmp *In Situ* PCR System 1000にセットするまで、スライドは加熱したプラットフォームにのせて置いて下さい。

4-4. 本体へのセット

1. サンプルブロックの前にあるスライド・リテイニング・レバーを上げます(図4-8)。
   これを動かすと、スライドを押さえ付ける役目のリテイニング・ストリップがスライドから離れるので、スライドを出し入れすることができます。

警告 "Hot Start" を行っている場合、サンプルブロックが熱くなっています(70℃)。図4-8のようにスライドの一番上端を持ってブロック内へ差し込んで下さい。

2. 70℃に加熱したGeneAmp *In Situ* PCR System 1000へスライドを、図4-8のように差し込んで下さい(1分以内)。

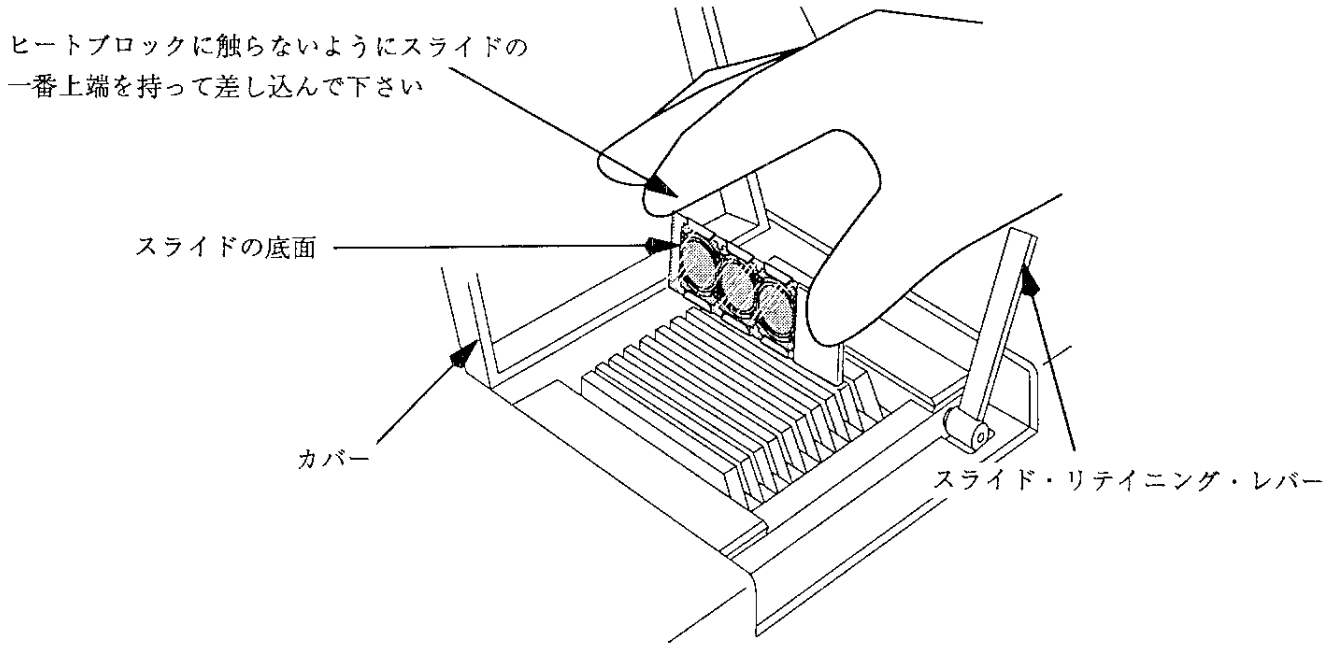


図4-8. スライドアッセンブリーのセット方法

3. 図4-9のように、それぞれのスライドはAmpliCover Clip の上の面が右にくるように(AmpliCover Clipのツメを左にして)サンプルブロックへ差し込みます。

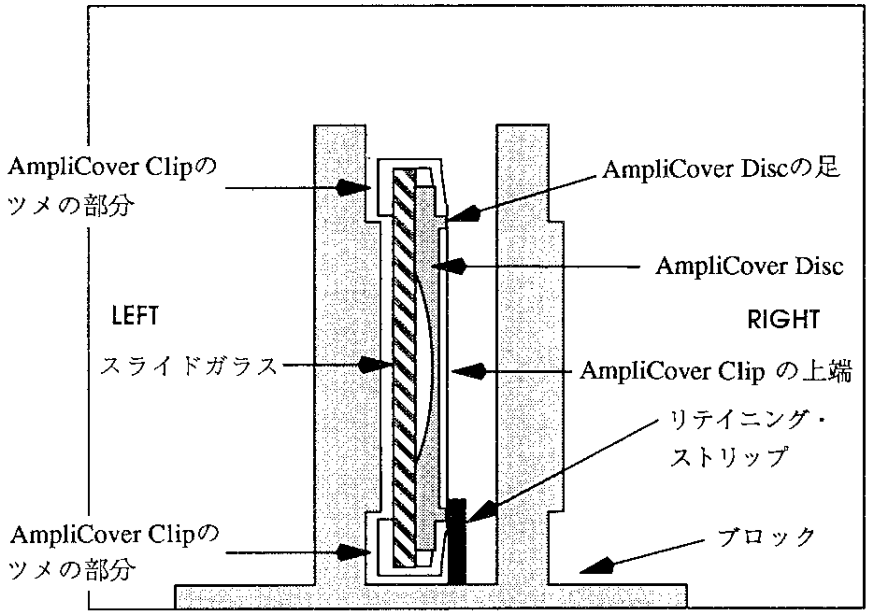


図4-9. GeneAmp *In Situ* PCR System 1000にスライドガラスをセットしたときの断面図

重要 次のスライドをのせるまで、各スライドは必ずサンプルブロックにセットしたままで、カバーを閉じておいて下さい。

4. 全てのスライドをサンプルブロックにセットした後、スライド・リテイニング・レバー を元の位置に戻します(右から左に)。これによりスライド・リテイニング・ストリップが各スライドを押さえることで、サンプルブロック内に固定されます。

5. 最後にカバーを閉じて下さい。

4-5. スタートラン

これまでPCRメソッドファイルの作成のなかでプログラムを組み、"Hot Start" Soak File #8をスタートさせました。その後1セグメントStep-Cycle File #11をスタートさせて, Step-Cycle File #12 を数サイクルだけ空運転してみました。ここでは、実際にサンプルをセットして、第３章で作成したファイルを動かします。

重要　"Hot Start" Soak File #8を実行している場合、メソッドをスタートする前に止める必要があります。"Hot Start" を行っていなければ、そのまま次のセクション"メソッドのスタート"に進んで下さい。

P54 "4-1-2. 作業環境の準備" の8でスタートした"Hot Start" Soak Fileを以下の手順で止めて下さい。

< "Hot Start" Soak Fileの中止 >

1. **Stop**キーを押します。以下の画面が表示されます。

ABORT File ?
Press STOP or START

2. 再度**Stop**キーを押して"Hot Start" Soak Fileを止めます。
Soak Fileの初期画面が表示されます。

SOAK FILE
File #8

＜メソッドのスタート＞

File、**11**、**Enter** の順に押します。

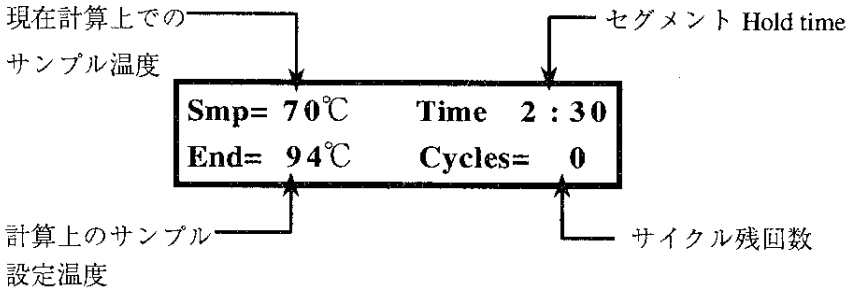
STEP-CYCLE FILE
File #11

1. **Start**キーを押すと、プリンターを接続している場合、次の画面が現われます。

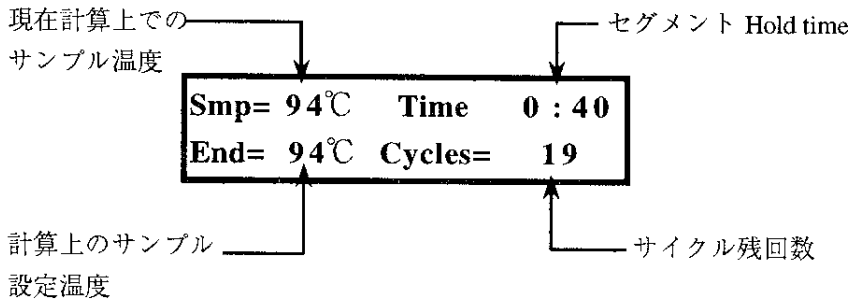
Select Print Mode
OFF-ON

2. 初期の状態 (OFF)で、**Enter**を押します。

3. Step-Cycle Fileをスタートしますと、以下のような画面が表示されます。

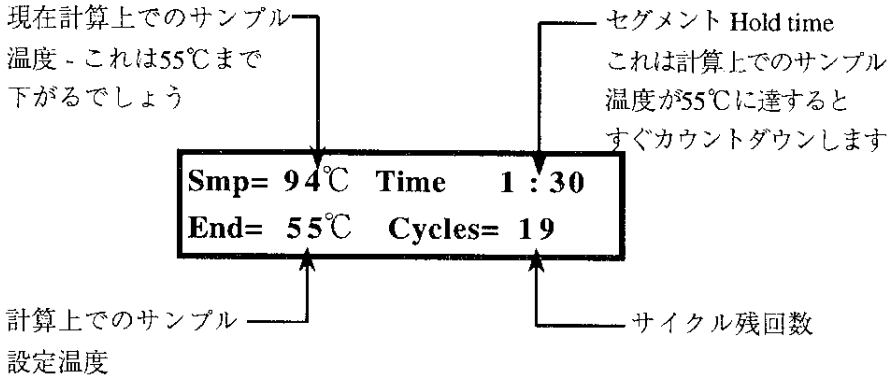


4. 変性用のStep-Cycle File が完了すると、メソッドで次の増幅用 Step-Cycle File が自動的に始まり、以下の画面が表示されます。

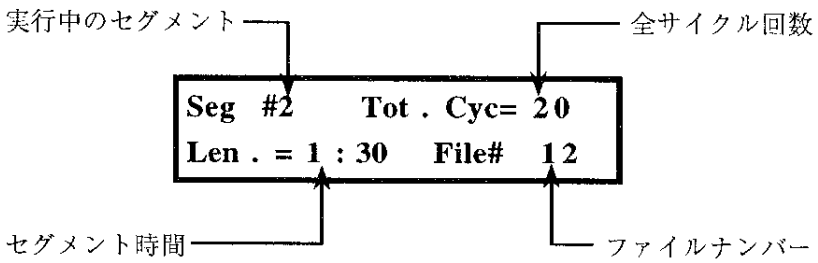


この画面はFile #12 の最初のサイクルの最初のセグメント(変性用)のパラメーターです。

5. 変性セグメントが終わるとすぐ、セグメント2のパラメーター、アニーリング/伸長セグメントが表示されます。

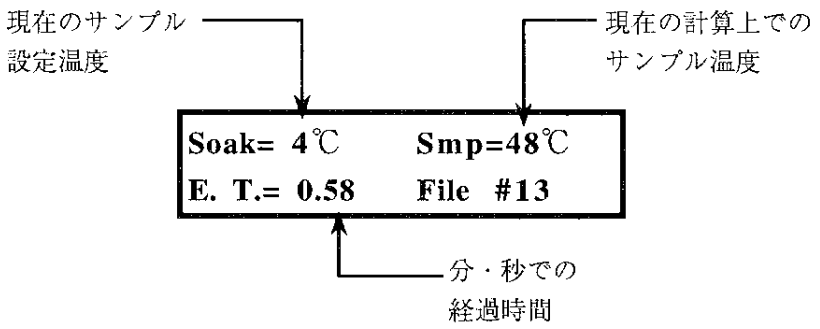


Helpキーを押しますと、2番目の画面が表示されます。



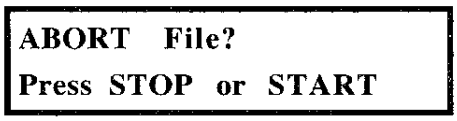
再度**Help**キーを押すと前の画面に戻ります。
このプロセスは、残りの19サイクルすべてが終了するまで続きます。

6. File #12が終了すると、File #13の"Storage" Soak Fileが始まり、
以下の画面が表示されます。



経過時間 (E. T.)は、"Storage" Soak File が始まるとすぐにカウントアップし始めます。

7. PCR後の操作が用意できましたら、**Stop**キーを押して止めて下さい。
以下の画面が表示されます。



8. 再度**Stop**キーを押して下さい。Soak Fileの最初の画面が表示されます。

4-6. AmpliCover Clip/Discアッセンブリーの外しかた

In Situ PCR終了後、Disassembly Toolを使って各スライドからAmpliCover Clip / Disc アッセンブリーを外します。

AmpliCover Clip/Disc アッセンブリーを外すために、以下の手順で行って下さい。

1. 図4-10のようにClipの下が上に向くように(ツメの面が上)、スライドを裏返します。

2. 最初のAmpliCover Clip/Discアッセンブリーのツメを図4-10に示したDisassembly Tool の土台に付いている４つのピンの間に入るように、スライドを Disassembly Tool にのせます。

3. 図4-11のようにRemoval Toolを使って、手前から外に、少し下に向けてツメを押します。 この操作でツメが緩まるので、AmpliCover Clipをスライドから外すことができます。

4. Disassembly Tool からスライドを外し、AmpliCover Clipをスライドから外します。

5. ピンセットを使ってAmpliCover Disc を静かに外します。
AmpliCover Discを取り外すとき、AmpliCover Discをスライド上でずらさないで下さい。組織や細胞がスライドからはがれることがあります。

6. 再度スライドをひっくり返して次のサンプルのAmpliCover Disc / Clipを外します。

重要 Disassembly Tool の土台にスライドをひっくり返してのせるとき、図 4-11のようにスライドが土台に対して平行になっていることを確認して下さい。平行になっていないと、既にDiscとClipを外したサンプルに傷がついてしまうことがあります。

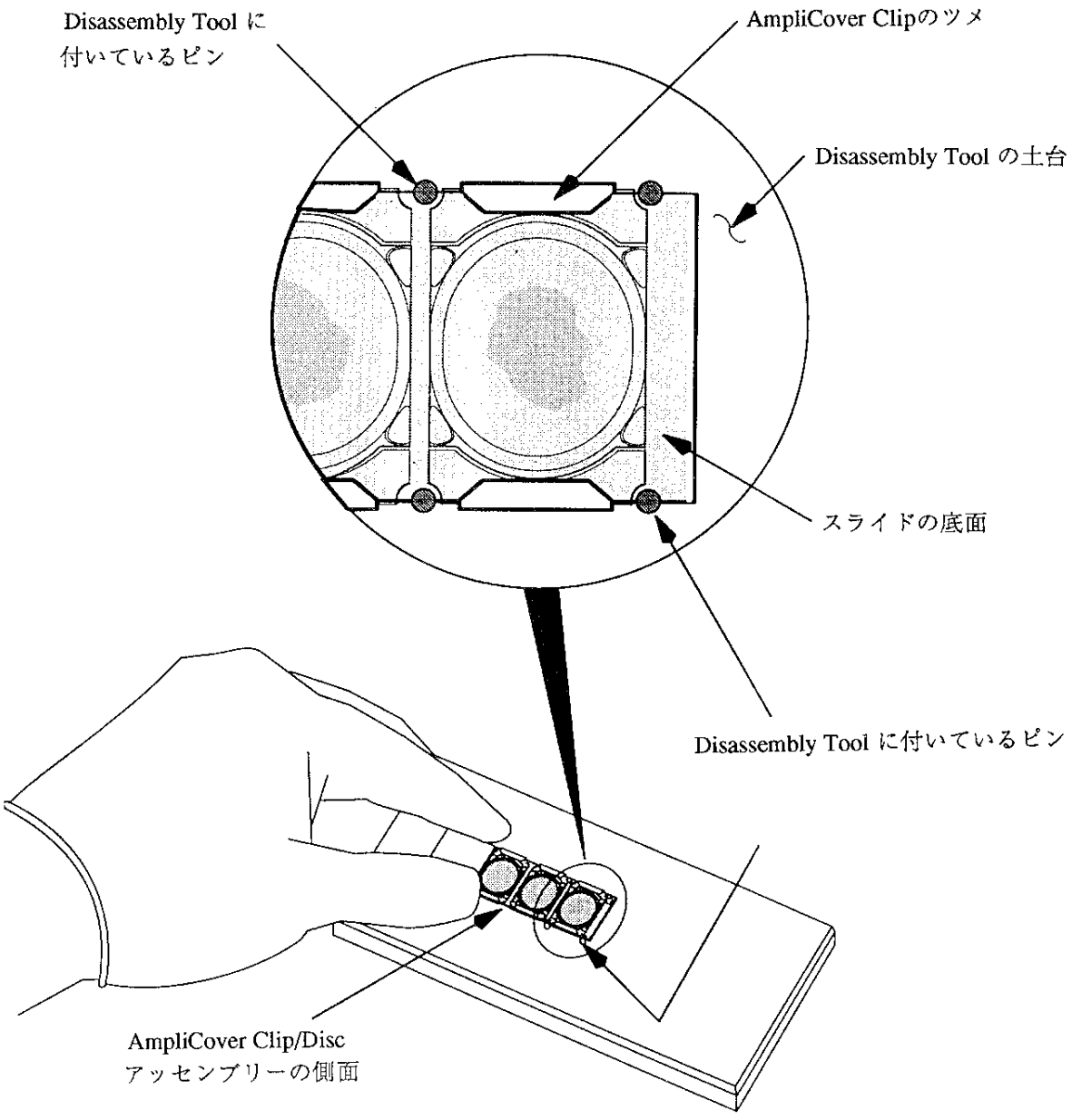
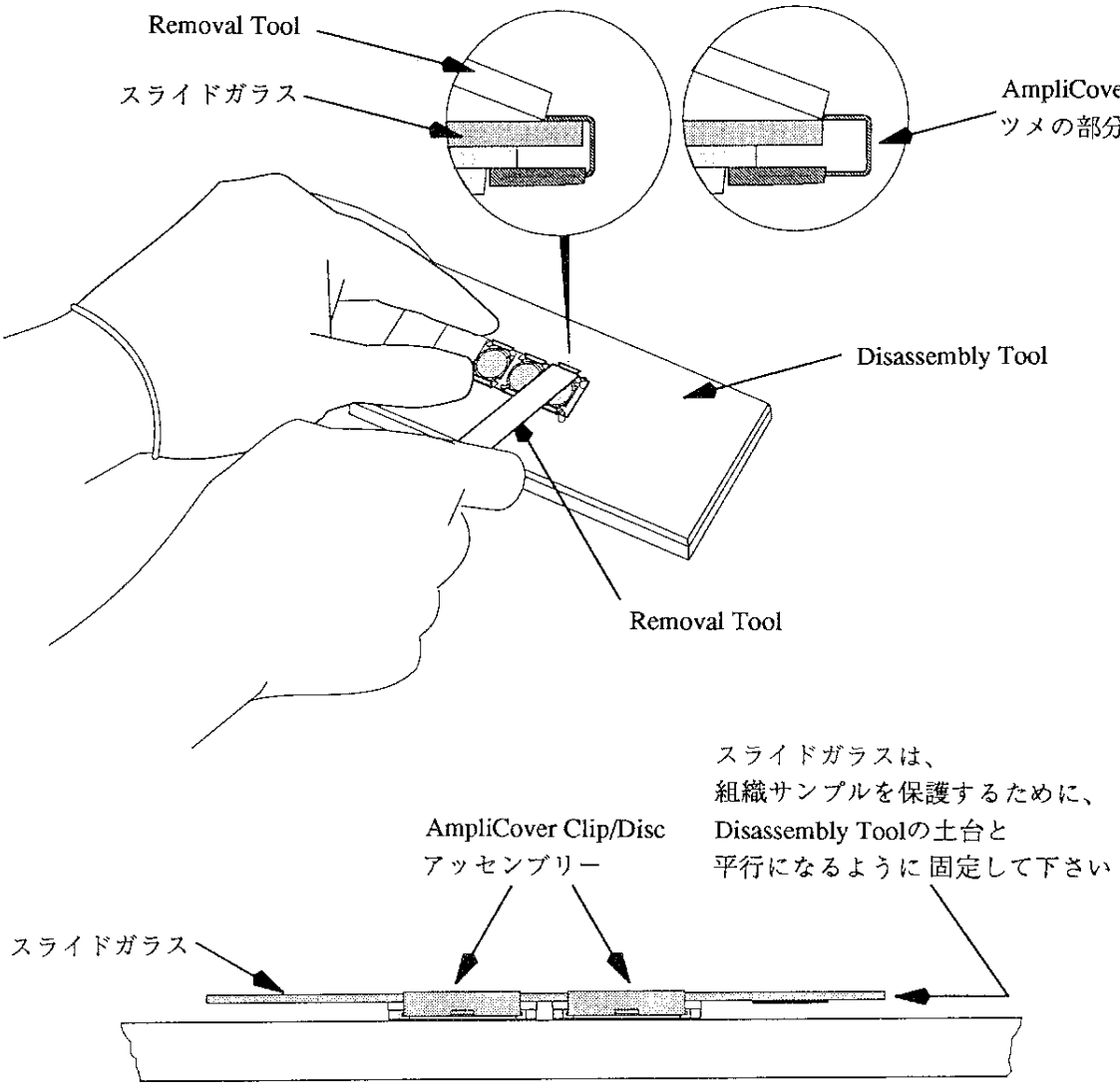


図 4-10. Disassembly Tool でのスライドの位置



Edge View of Slide on Base of Disassembly Tool

図 4-11. スライドからAmpliCover Clipを外す方法

第5章

GeneAmp *In Situ* PCR System 1000 のメンテナンス

この章では、GeneAmp *In Situ* PCR System 1000の日常のメンテナンス方法について説明します。

5-1. GeneAmp *In Situ* PCR System 1000のメンテナンス法

5-1-1. サンプルブロックのクリーニング

5-1-2. 装置外面のクリーニング

5-1-3. ヒューズの交換

5-1. GeneAmp *In Situ* PCR System 1000のメンテナンス法

5-1-1. サンプルブロックのクリーニング

縦に並んでいるサンプルスロットは、綿布で定期的にクリーニングして、ほこりを取り除いて下さい。

5-1-2. 装置外面のクリーニング

GeneAmp *In Situ* PCR System 1000本体の外面は、市販の中性洗剤でほこりや油分を除去して下さい。
研磨剤入りのクリーナーは絶対使用しないで下さい。研磨剤入りのクリーナーを使用しますと、塗装やアノード酸化被膜にキズがついたり、プラステック材の表面が曇ったりします。

装置の画面に有機溶媒や接着剤(種類を問わず不可)を使用しないで下さい。

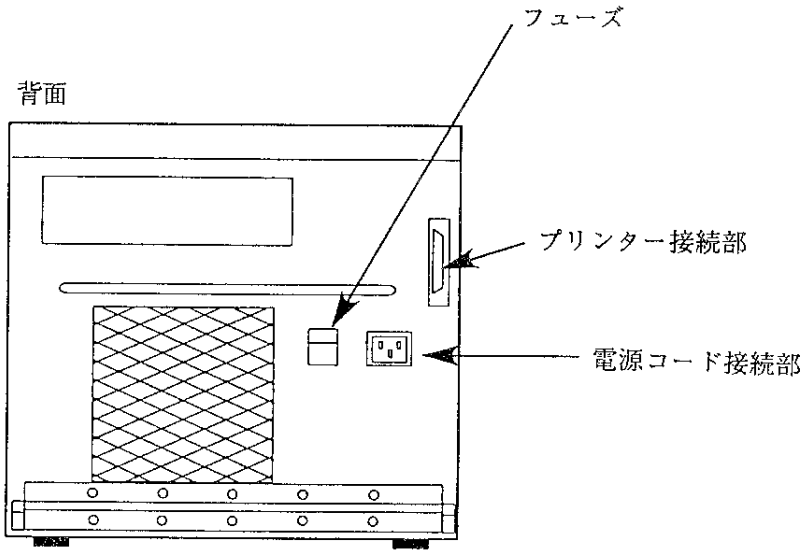
5-1-3. ヒューズの交換

警告 出火等の事故を防ぐために、交換するヒューズは正しい規格のヒューズと交換して下さい。

GeneAmp *In Situ* PCR System 1000 には、12-Amp Slow-Blow 250V ヒューズが装置の背面に装着されています。

ヒューズを交換するには

1. 装置を停止後、装置の背面から電源コードを外して下さい。



2. ヒューズは、装置の背面にある取り外し可能なコンパートメントの中にあります。

3. ヒューズカバーを押し下げて、ヒューズカバーを引き抜きます。

4. ヒューズカバーからヒューズを引き抜き新しいヒューズと交換 して下さい。

5. ヒューズカバーを装置にセットし、固定されるまで押し付けて下さい。装置の電源コードを再び接続して下さい。

第6章
トラブルシューティング

この章では、基本的なトラブルシューティングを表にまとめました。
次のようなトラブルが起こりましたら表に従って対処してください。

6-1. トラブルシューティング

6-2. 使用中に停電等で電源が切れた場合

6-1. トラブルシューティング

本章には、GeneAmp *In Situ* PCR System 1000を使用する際に生じる問題に関して、基本的なトラブルシューティングがまとめられています。
参考にしてトラブルに対処して下さい。

症状	原因	対処
メインスイッチをONにしても電源が入らない。	電源コードが外れかけているか外れている。	電源コードを確かめる。
画面に何も表示されずコンプレッサモーターの音がしない。	メインフューズが切れているか、コントローラートラブル。	メインフューズを交換して下さい。
スイッチを入れても画面に何も映らないか、キー操作がうまくいかない。	logic/power supply フューズが切れているかコントローラの故障。	フューズを交換するか、フィールドサービスにご連絡下さい。
表示されているサンプル温度と実際のブロック温度が違っている。	温度補正ができていない。	P6の"1-4. 冷却システムおよび加熱システムのチェック"を行って下さい。
加熱又は冷却が遅い。	コントローラ等の電気または機械的な故障。	サイクラー周辺の空気の流れをチェックして下さい。 diagnostic #3 (Heater test) を実行して、加熱速度を記録して下さい。 4℃Soak File を実行し、15分以内に設定温度に達するか確認して下さい。 これらのテストがFailした時はフィールドサービスまでご連絡下さい。
本体の電源を入れた時エラーメッセージが表示される。	メインシステム内のひとつが故障 電源電圧が低すぎる	フィールドサービスまでご連絡下さい。 電源を他の装置と共有していないか、延長コードを使用していないか確認して下さい。 ヒーターをつけて(Heater test)で電源電圧を確認して下さい。

6-2. 使用中に停電等で電源が切れた場合

作動中に電源が切れた場合、電源が切れたときの状態によって、以下のケースが考えられます。

●ファイルを作成していた場合、そのファイルは失いますので、初めからファイルを作成する必要があります。

●ファイルがSTOREされた後であれば、そのファイルは失われません。

●ラン中の場合、そのランを電源が切れた時点から続けることはできません。但し、再びそのランを初めから実行することはできます。

付　録

付録I. 仕 様

サンプル容量	最大30サンプル（1枚当たり3サンプルを分析できる *in situ* PCR スライドガラスを10 枚まで使用可能）
サンプルブロック	25×75 mm, 厚さ 1.2 mm のスライドガラスを保持
温度範囲	- 5℃～99℃
温度表示	1℃単位（サンプル温度の算出および設定）
温度精度	±1.0 ℃（35～99℃）
温度均一性	±0.5℃（クロックスタート後90秒後）
加熱・冷却速度	1℃／秒（サンプルブロック平均値）
温度キャリブレーション	NIST (National Institute for Standards and Technology, U.S.)準拠の規格において較正
ディスプレイ	2×20文字 蛍光ディスプレイ
内部メモリー数	予めプログラムされたファイル4個、デモンストレーションファイル2個、カスタマイズ用ユーザーファイル93個（編集／保存可能）
寸法	幅：33 cm　奥行：52.1 cm　高さ：30.5 cm　重量：29.5 kg
電源	電圧：100 VAC　　周波数：50/60 Hz

付録 II. GeneAmp® *InSitu* PCR System 1000用キット／アクセサリー

Model IS-1000

商品番号	商品名	容量	単位	価格
キット				
N808-0197	GeneAmp® *In Situ* PCR Core Kit　(-20℃保存) 内訳: ・AmpliTaq® DNA Polymerase IS,　20U/μl ・dATP/dCTP/dGTP/dTTP (10mM, 320μl each) ・GeneAmp®10×*In Situ* PCR Buffer ・$MgCl_2$ 溶液 (25mM, 3ml)	200反応分	1式	¥80,000.-
***In Situ* PCR System 1000 用 アクセサリー**				
N804-0500	AmpliCover™ Discs	50個		¥8,000.-
N804-0501	AmpliCover™ Clips	10個		¥8,000.-
N804-0100	Assembly Tool	1式		130,000.-
N804-0022	Disassembly Tool	1式		¥8,000.-
N804-0502	*In Situ* PCR Glass Slides	70枚		¥11,000.-
903532	PCR *In Situ* Hybridization	1冊		¥15,000.-

付録 III. 確認書

GeneAmp® *In Situ* PCR System 1000を病原体、放射性物質、毒性または発ガン性物質を含む実験施設、検査施設内で使用した後、修理依頼、交換、返品のため弊社に返送する場合、P87～88の確認書をコピーのうえ必要事項を記入し、必ず添付して下さい。また、修理を行う者に対しても、必ず提示するように願います。

確　認　書

CERTIFICATION OF DECONTAMINATION

この確認書は病原体、放射性物質、毒性または発ガン性物質を含む実験施設、検査施設内で使用した機器を修理依頼、交換、返品のため（株）パーキンエルマージャパン アプライドバイオシステムズ事業部に送り返すときは、必要事項を記入し、必ず添付してください。また、修理を行う者に対しても、必ず提示するように願います。

This completed document must accompany any Perkin-Elmer product which is to be returned to Perkin-Elmer Japan Co., Ltd. Applied Biosystems Division for the purpose of repair ,refurbishing,trade in ,or replacement.This completed document must also be displayed to any Service Engineer before he performs service on any Perkin-Elmer equipment which has located within a biological laboratory.

機種名 GeneAmp *In Situ* PCR System 1000	製造番号 (Serial Number)	購入日　年　月　日

1. 組換えDNA実験に使用したか。

Has this product been exposed to any recombinant agents? If so,Please indicate the highest Biosafety Level laboratory in which the product was used:

□使用していた（封じ込めレベル:　　）　　□使用していない

Yes　　(Biosafety Level)　　No

2. 病原性微生物、ウイルス等を含むか、またはその恐れのある実験に使用したか。

Has this product been exposed to any infectious agents assigned to Biosafety Levels 2,3,or 4?

If so, please indicate agent and Biosafety class, if known.

□使用していた（予研の安全レベル:　　）　　□使用していない

Yes　　(Biosafety Class)　　No

3. RIを含む実験に使用したか。

Has this product been exposed to radioactive substances?　If so, please indicate types.

□使用していた（核種:　　）　　□使用していない

Yes　　Type　　No

4.毒性または発ガン性物質を含む実験に使用したか。

Has this product been exposed to toxic or carcinogenic substance?　If so, please indicate types.

□使用していた（物質名:　　）　　□使用していない

Yes　　Type

5.機器が汚染されていたときの洗浄、除染の方法を裏面に記述してください。

Please describe on the back of this paper how equipment was cleaned or disinfected.

私は、上記の機器の汚染状況については、充分な検査と適切な除染を行って、修理のため取り扱っても安全であることを確認しています。

I certify that the instrument or instrument parts which are in need of repair or service, are safe to service. I certify that the product has been cleaned or disinfected as described above,and that this process is adequate to remove or render harmless any toxic,carcinogenic,radioactive,or biohazardous agents to which the product has been exposed. I understand that the company for the purpose of repair has no obligation to repair or service any product unless adequate information is provided to assure the safety of all personnel handling the exposed product.

日付 (Date)　　年　月　日

会社名・所属(Company Name)

役職(Title)

氏名(Preparer's PRINTED Name)

印 (Signed)

電話番号(Phone)　　内線(EXT.)

● 機器が汚染されたときの洗浄、除染の方法を記述してください。

PERKIN ELMER

株式会社パーキンエルマージャパン
アプライドバイオシステムズ事業部

本　社：〒279 千葉県浦安市美浜 1-9-2
TEL.0473(80)8500／FAX.0473(80)8505
名古屋：〒464 愛知県名古屋市千種区池下町2-15
TEL.052(764)1201／FAX.052(764)1202
大　阪：〒564 大阪府吹田市豊津町 13-18
TEL.06 (389)1201／FAX.06 (389)1206
福　岡：〒812 福岡県福岡市東区馬出 2-1-7
TEL.092(641)2510／FAX.092(641)0886

■学術的お問い合わせは下記まで
フリーダイヤル TEL 0120 - 477392
フリーダイヤル FAX 0120 - 477120

MIS1000J9506BK